

Versuche zur Spaltung und Resynthese der D-Oxynitrilase

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Otfried Müller
aus Kassel

Marburg/Lahn 1977

Versuche zur Spaltung und Resynthese der D-Oxynitrilase

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Otfried Müller
aus Kassel

Marburg/Lahn 1977



Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am 5.12.1977

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1977

Berichterstatter : Prof. Dr. E. Pfeil

Mitberichterstatter : Prof. Dr. H. Follmann

Die vorliegende Arbeit wurde im ersten Jahr durch ein Stipendium des Verbandes der Chemischen Industrie unterstützt.

1. Einführung	1
2. Zielsetzung	2
3. Methodik	3
4. Ergebnisse	4
5. Diskussion	5
6. Zusammenfassung	6
7. Literaturverzeichnis	7
8. Anhang	8
9. Glossar	9
10. Index	10
11. Bibliographie	11
12. Literaturverzeichnis	12
13. Anhang	13
14. Glossar	14
15. Index	15
16. Bibliographie	16
17. Literaturverzeichnis	17
18. Anhang	18
19. Glossar	19
20. Index	20
21. Bibliographie	21
22. Literaturverzeichnis	22
23. Anhang	23
24. Glossar	24
25. Index	25
26. Bibliographie	26
27. Literaturverzeichnis	27
28. Anhang	28
29. Glossar	29
30. Index	30
31. Bibliographie	31
32. Literaturverzeichnis	32
33. Anhang	33
34. Glossar	34
35. Index	35
36. Bibliographie	36
37. Literaturverzeichnis	37
38. Anhang	38
39. Glossar	39
40. Index	40
41. Bibliographie	41
42. Literaturverzeichnis	42
43. Anhang	43
44. Glossar	44
45. Index	45
46. Bibliographie	46
47. Literaturverzeichnis	47
48. Anhang	48
49. Glossar	49
50. Index	50
51. Bibliographie	51
52. Literaturverzeichnis	52
53. Anhang	53
54. Glossar	54
55. Index	55
56. Bibliographie	56
57. Literaturverzeichnis	57
58. Anhang	58
59. Glossar	59
60. Index	60
61. Bibliographie	61
62. Literaturverzeichnis	62
63. Anhang	63
64. Glossar	64
65. Index	65
66. Bibliographie	66
67. Literaturverzeichnis	67
68. Anhang	68
69. Glossar	69
70. Index	70
71. Bibliographie	71
72. Literaturverzeichnis	72
73. Anhang	73
74. Glossar	74
75. Index	75
76. Bibliographie	76
77. Literaturverzeichnis	77
78. Anhang	78
79. Glossar	79
80. Index	80
81. Bibliographie	81
82. Literaturverzeichnis	82
83. Anhang	83
84. Glossar	84
85. Index	85
86. Bibliographie	86
87. Literaturverzeichnis	87
88. Anhang	88
89. Glossar	89
90. Index	90
91. Bibliographie	91
92. Literaturverzeichnis	92
93. Anhang	93
94. Glossar	94
95. Index	95
96. Bibliographie	96
97. Literaturverzeichnis	97
98. Anhang	98
99. Glossar	99
100. Index	100

A. Theoretischer Teil

1. Einführung mit Verzeichnis der verwandten Abkürzungen	11
2. Allgemeine Vorbemerkungen	12
2.1. Reaktionsmodell zur Spaltung und Resynthese	12
2.2. Fehlerbetrachtung	15
3. Spaltung	16
3.1. Vorbemerkungen	16
3.2. Physikochemische Eigenschaften des FAD	17
3.2.1. Fluoreszenz	17
3.2.2. UV/Vis-Spektrum	23
3.3. Fluoreszenzeigenschaften der Oxynitrilase	24
3.4. Meßergebnisse	26
3.4.1. pH-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion	26
3.4.2. Temperaturabhängigkeit der Spaltungsreaktion	31
3.4.3. UV-Spektrum zur Spaltung	32
4. Resynthese	33
4.1. Vorbemerkungen	33
4.2. Fluorimetrische Ergebnisse	33
4.2.1. Reaktionsordnung der Resynthese	34
4.2.2. pH-Abhängigkeit der Resynthese	37
4.2.3. Temperaturabhängigkeit der Resynthese	40
4.3. Polarimetrische Ergebnisse	41
4.3.1. Standardmessung	41
4.3.2. Aktivitätsvergleich zwischen dem Holoenzym und seinen Isoenzymen	42
4.3.3. Zeitabhängigkeit der katalytischen Aktivität	43
4.3.4. Inhibitorversuche	45
4.3.4.1. Inkubationsversuche	47

4.3.4.2.	Resyntheseversuche	48
4.4.	Resyntheseversuche auf Sephadex-Gel (Gelfiltration)	51
4.4.1.	Vorbemerkungen	51
4.4.2.	Meßergebnisse	51
4.5.	Spektroskopische Untersuchungen zur Resynthese	56
4.5.1.	UV/Vis-Spektren	56
4.5.2.	CD-Spektrum	56
4.5.3.	Fluoreszenzspektrum	56
5.	Thermodynamische Größen	59
5.1.	Thermodynamische Größen in Abhängigkeit vom pH-Wert	59
5.1.1.	Gleichgewichtskonstante K	59
5.1.2.	Freie molare Standardreaktionsenthalpie	63
5.2.	Thermodynamische Größen bei pH 4	65
5.2.1.	Aktivierungsenergie	65
5.2.2.	Molare Standardreaktionsenthalpie	66
5.2.3.	Freie molare Standardreaktionsenthalpie	66
5.2.4.	Molare Standardreaktionsentropie	69
6.	Molekülmassenbestimmung	70
6.1.	Gelfiltrationsmethode	70
6.2.	Kinetische Methode	73
7.	Diskussion	74
7.1.	Folgerungen aus den Inhibitorversuchen	74
7.1.1.	Bindungsart des FAD	74
7.1.2.	Bindungsstellen des FAD	75
7.2.	Addition des FAD an das Protein	77
7.3.	pH-Einfluß auf Spaltung und Resynthese	81
7.4.	Konformationsänderungen	83
7.5.	Funktion des FAD	85
7.6.	Katalysemechanismus	85
8.	Zusammenfassung	88

B. Praktischer Teil	
9. Reindarstellung der Oxynitrilase	95
10. Auftrennung der Oxynitrilase in ihre Isoenzyme	96
11. Fluoreszenzmessungen	99
11.1. Meßgerät und Eichkurven	99
11.2. Spaltungsreaktion	101
11.2.1. pH-Bereich	101
11.2.2. Durchführung der Messung	102
11.2.3. Auswertung	106
11.3. 1. Stufe der Resynthese	106
11.3.1. Darstellung des Apoproteins	106
11.3.2. Bestimmung der Extinktion des Apoproteins	108
11.3.3. pH-Bereich	110
11.3.4. Durchführung der Messung	110
11.3.5. Auswertung	114
12. Messungen am Polarimeter	115
12.1. Meßgerät und Substanzen	115
12.2. Standarddrehtest	115
12.3. Auswertung	116
12.4. Inkubationsmessungen	117
12.5. Resynthesen mit Inhibitoren	117
13. Resynthesen auf Sephadex-Gel	118
14. Molekülmassenbestimmung	119
14.1. Gelfiltrationsmethode	119
14.2. Kinetische Methode	119
15. Literaturverzeichnis	120

In dieser Arbeit bedeuten Zahlen in eckigen Klammern [] Hinweise auf das Literaturverzeichnis.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Theoretischer Teil

1. Einführung

Verzeichnis der verwandten Abkürzungen

Ade	Adenin
Ado	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APo	Apoprotein der Oxynitrilase
ATP	Adosintriphosphat
BA	Benzaldehyd
Cyhy	Cyanhydrin
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
HOLO	native Form der Oxynitrilase
Isalloxazin	7,8-Dimethyl-Isoalloxazin
Iso	Isoenzym der Oxynitrilase
Kat	katalytisch wirksame Stufe der Oxynitrilase nach der Resynthese
Komb	katalytisch inaktives Rekombinationsprodukt aus FAD und dem Apoprotein der Oxynitrilase
Oxase	Oxynitrilase
Rb	Riboflavin

Das Enzym D-(+)-Hydroxynitril-Aldehyd-Lyase (Mandelonitril-Lyase, E.C. 4.1.2.10. der Enzymliste [1], hier Oxynitrilase (Oxase) genannt) ist zusammen mit dem Emulsin seit 1908 Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen, deren wichtigsten Ergebnisse bei GERSTNER zusammenfassend berichtet werden [2]. BECKER stellte die Oxynitrilase erstmals rein dar [3] und bestimmte FAD als ihre prosthetische Gruppe. Bemerkenswerterweise katalysiert die Oxynitrilase keine Redoxreaktion, wie es aus der Gegenwart von FAD zu erwarten wäre, sondern die Bildung optisch aktiver Cyanhydrine [4]. Allerdings steht die Oxynitrilase in dieser Hinsicht nicht allein, denn GUPTA und VENNESLAND [5] berichten von der Glyoxylat-Carboligase, die ebenfalls FAD enthält und keine Redoxreaktion katalysiert.

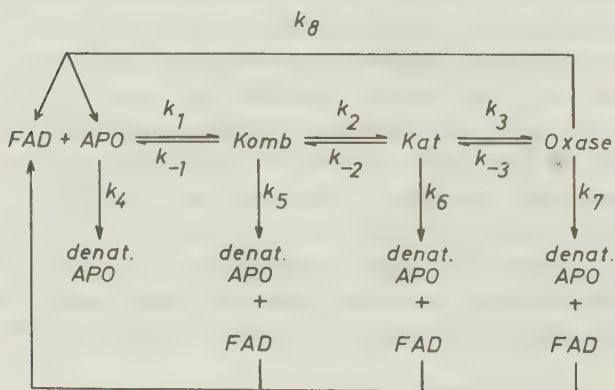
Bislang kennt man nur wenige Flavoenzyme mit kovalent gebundenem Flavin wie zum Beispiel nach HATEFI und STIGGALL [6] die Succinat-Dehydrogenase und die Monoamin-Oxidase. PINTO und FRISELL fanden mit der Sarkosin-Dehydrogenase von Pseudomonas ein weiteres Enzym, bei dem das Flavin nach EDMONDSON und SINGER kovalent über das 8α -C-Atom des Isalloxazinteiles an das 3-N-Atom eines Histidins gebunden ist; und bei der D-6-Hydroxynicotin-Oxidase und der Succinat-Dehydrogenase soll es sich ebenfalls um solche 8α -[N(3)-histidyl]-Flavin-Proteine handeln [7].

2. Allgemeine Vorbemerkungen

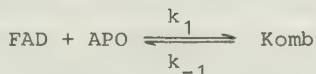
2.1. Reaktionsmodell zur Spaltung und Resynthese

Nach ASCHHOFF [8] läßt sich die Oxynitrilase reversibel spalten und resynthetisieren, und zwar verläuft die Resynthese von Apoprotein und FAD zum Holoenzym über mehrere Stufen [9].

Aufgrund der später noch zu beschreibenden Versuche wird zunächst für die formale Beschreibung der Reaktionsparameter folgender Reaktionsverlauf angenommen, wobei sich die mathematische Behandlung der Reaktion ebenfalls auf die späteren Ergebnisse stützt.



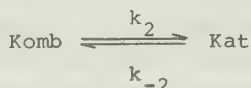
In der ersten Stufe vereinigt sich das FAD mit dem Apoprotein (APO). Diese Rekombination stellt die Hauptreaktion innerhalb der Reaktionskette im Sinne der vorliegenden Arbeit dar.



Dem entspricht die Gleichung

$$\frac{[\text{Komb}]}{[\text{APO}][\text{FAD}]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = K_1 \quad (1)$$

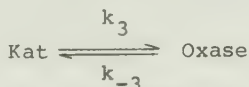
"Komb" ist das Addukt der beiden Reaktionspartner. Dieses erste Reaktionsprodukt besitzt allerdings noch keinerlei katalytische Aktivität. Im weiteren Verlauf der Reaktion gruppieren sich der Proteinanteil und das FAD soweit um, bis die erste, schwache Aktivität zu verzeichnen ist. Diese zweite Stufe wird hier mit "Katalysator" (Kat) bezeichnet.



entsprechend gilt

$$\frac{[\text{Kat}]}{[\text{Komb}]} = \frac{k_2}{k_{-2}} = K_2 \quad (2)$$

Das katalytisch aktive Reaktionsprodukt lagert sich in einer ebenfalls zunächst als reversibel angenommenen Reaktion um, bis es der Holo-Form des Enzyms entspricht. Damit hat sich die Oxynitrilase (Oxase) wieder zurückgebildet, und die Resynthese ist abgeschlossen.



Das Gleichgewicht kann beschrieben werden durch die Gleichung

$$\frac{[\text{Oxase}]}{[\text{Kat}]} = \frac{k_3}{k_{-3}} = K_3 \quad (3)$$

Aus (1), (2) und (3) folgt die Beziehung

$$\frac{[\text{Oxase}]}{[\text{APO}][\text{FAD}]} = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 = K \quad (4)$$

Die Anzahl der einzelnen in vitro ablaufenden Reaktionsstufen ist wahrscheinlich größer als hier angenommen, so daß Gleichung (4) genau genommen die Form

$$\frac{[\text{Oxase}]}{[\text{APO}][\text{FAD}]} = K_1 \cdot K_2 \cdot \dots \cdot K_n = K$$

haben müßte. Doch wenn man mehrere Elementarschritte der Resynthese zu größeren Reaktionseinheiten zusammenfaßt, läßt sich die Beschreibung der Resynthese wie geschehen auch in drei Hauptschritten vereinfacht wiedergeben.

Unter der Annahme, daß bei der zweiten und dritten Teilreaktion nur innermolekulare Umlagerungen stattfinden, sind die Konzentrationen der Zwischenprodukte der Konzentration des Endproduktes gleich. Aus diesem Grunde ist es möglich, die letzte Teilreaktion der Spaltung bzw. die erste Teilreaktion der Resynthese zu untersuchen, ohne die Geschwindigkeitskonstanten k_2 , k_3 , k_{-2} und k_{-3} sowie die Konzentration [Komb] zu kennen.

Eine Untersuchung der Bindungsstellen am Protein wurde nicht vorgenommen, da zur Zeit der Durchführung der vorliegenden Arbeit noch keine Angaben über die Aminosäuresequenz bekannt waren. Ergebnisse zur Aminosäuresequenz wurden erst in jüngerer Zeit veröffentlicht [10].

2.2. Fehlerbetrachtung

Die Oxynitrilase ist im neutralen Medium verhältnismäßig stabil. Dennoch unterliegt sie in Lösung einer ständigen, langsamen Denaturierung. Diese beschleunigt sich um so mehr, je weiter sich der pH vom Neutralpunkt entfernt. Wenn man die Konzentration des nicht denaturierten Enzyms in Abhängigkeit von der Zeit t allgemein mit

$$[\text{HOLO}]_t = [\text{Oxase}]_0 \cdot e^{-k_7 t} \quad (5a)$$

beschreibt, dann beläuft sich die Konzentration des freien, rekombinationsfähigen Apoproteins entsprechend auf

$$[\text{APO}]_t = [\text{APO}]_0 \cdot e^{-k_4 t} \quad (5b)$$

und die Konzentrationen der reaktiven Zwischenprodukte Komb bzw. Kat auf

$$[\text{Komb}]_t = [\text{Komb}]_0 \cdot e^{-k_5 t} \quad (5c)$$

$$[\text{Kat}]_t = [\text{Kat}]_0 \cdot e^{-k_6 t} \quad (5d)$$

Im neutralen Bereich und bei allen pH-Stufen, bei denen die Rekombination die Spaltung überwiegt, gilt $k_7 \ll k_3$ [11], und Entsprechendes ergibt sich auch für die Resynthesezwischenprodukte. Daher gilt auch

$$k_5 \ll k_2 \quad \text{und} \quad k_6 \ll k_3$$

$$k_5 \ll k_{-2} \quad \text{und} \quad k_6 \ll k_{-3}$$

so daß die Konzentrationen der eingesetzten Stoffe im allgemeinen konstant bleiben.

Kritischer wird es beim Apoenzym, welches in Lösung zur Resynthese bereitgehalten wird, da das Protein weder durch den natürlichen Partner FAD noch durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stabilisiert wird. Lediglich durch sorgfältiges Kühlen im Eiswasser und

durch Verwendung von Pyrophosphatpuffer läßt sich das Apoenzym halbwegs vor Denaturierung schützen. Man muß innerhalb von vier Stunden einen Verlust von rund einem Drittel der Ausgangsmenge veranschlagen [8], [9]. Bei den vorliegenden Messungen muß daher mit einem Fehler von bis zu 20 % gerechnet werden. Die Ursache hierfür liegt im wesentlichen in der langen Zeitspanne vom Beginn der photometrischen Konzentrationsbestimmung bis zur Ausführung der Resynthese. Aus diesem Grunde erübrigt sich auch eine Umrechnung von Konzentrationen in Aktivitäten.

Berücksichtigt man noch die Anzeigeungenauigkeit der benutzten Meßgeräte, so darf man unter Beachtung der Fehlersummutation Fehler bis zum Faktor 2 nicht ausschließen, insbesondere bei niedrigen Fluoreszenzmeßwerten. Innerhalb einer Meßreihe heben sich einige Fehler allerdings auch wieder auf, so daß namentlich die mit dem Polarimeter ermittelten Ergebnisse im 20 %-Bereich streuen sollten.

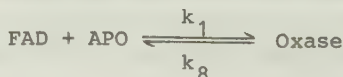
3. Spaltung der Oxynitrilase

3.1. Vorbemerkungen

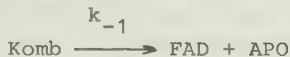
Es konnte nicht gezeigt werden, ob und in welcher Weise die saure Spaltung der Oxynitrilase über Zwischenstufen, etwa Oxase $\longrightarrow$ Kat $\longrightarrow$ Komb, verläuft, oder ob sich die Oxynitrilase direkt oder über andere Stufen in FAD und Apoprotein zersetzt. Da wegen der Überlegungen des letzten Abschnitts der Denaturierungseffekt gegenüber der Spaltung vernachlässigt werden darf, kann man die Konzentrationen der einzelnen Zwischenprodukte als gleich groß betrachten.

$$[\text{Oxase}] = [\text{Kat}] = [\text{Komb}] \quad (6)$$

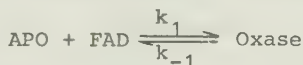
so daß für die Spaltung der Oxynitrilase gelten kann



Verläuft die Spaltung ohne die Bildung der Zwischenprodukte Komb und Kat, dann darf $k_8 = k_{-1}$ gesetzt werden, ebenso aber auch dann, wenn die Spaltung über diese oder andere Zwischenprodukte abläuft, denn aus allen Reaktionsmessungen ging hervor, daß bei der Spaltung entweder keine Zwischenprodukte auftreten oder aber $k_{-1} \ll k_{-2}$ bzw. $k_{-1} \ll k_{-3}$ ist, was besagt, daß mögliche Zwischenprodukte nur sehr kurzlebig sein können. Dabei wird



den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen. Aus diesem Grunde kann insgesamt unter Verwendung von (6) formuliert werden



Dem entspricht Gleichung (4).

Die Spaltung wird ähnlich dem von STRITTMATTER [12] angegebenen Verfahren im saueren Medium durchgeführt. In mäßig sauren Lösungen führt die Spaltung der Oxynitrilase zu einem Gleichgewicht.

3.2. Physikochemische Eigenschaften des FAD

3.2.1. Fluoreszenz

Vergleicht man das Fluoreszenzverhalten der drei Flavine FAD, FMN und Rb, so fällt hinsichtlich der pH-Abhängigkeit ein prinzipieller Unterschied zwischen FMN und Rb einerseits und FAD andererseits auf. Während FAD sich lediglich im Intervall von pH 1 bis pH 2 wie FMN und Rb verhält, gleichen sich FMN und Rb über alle pH-Stufen bis pH 10 ziemlich genau. Ab pH 2 wächst die Fluoreszenzausbeute von FAD nur noch geringfügig und erreicht bei pH 2,61 ein absolutes Maximum. Bei FMN und Rb hingegen steigt die Fluoreszenz weiter an, während sie bei

FAD wieder fällt und etwa bei pH 5,5 eine Ausbeute erreicht, welche rund 13 % der FMN-Fluoreszenz ausmacht (Abb. 1). Andere Autoren [13], [14] berichten von einer FAD-Fluoreszenz von 9 % bis 20 % der Rb-Fluoreszenz. Geringfügige Abweichungen der Fluoreszenzausbeuten sind zumeist eine Folge unterschiedlicher Anregungs- und Emissionsfrequenzen.

Unterhalb von pH 2 nimmt die Fluoreszenz wegen der steigenden Protonierung des Isalloxazinteils ab, und entsprechend steigert sich wegen der Deprotonierung bei FMN und Rb die Fluoreszenz wieder bis zum pH 4. Im Gegensatz zu FMN und Rb kann sich FAD bei fortschreitender Deprotonierung zu einem innermolekularen Komplex zusammenfalten, indem sich der Isalloxazinteil über den Adeninteil lagert [15], [16]. Diese Sandwichfaltung, die nach WEBER in wäßriger Lösung zu nahezu völliger Fluoreszenzlöschung führt, stellt einen nicht kovalenten, hydrophoben Komplex dar, der mit der fluoreszenzfähigen, offenen Form im Gleichgewicht steht. Dieses Gleichgewicht hängt u.a. vom pH, der Salzkonzentration und der Polarität des Lösungsmittels ab. Bei fallendem pH wird das Gleichgewicht zur offenen Form hin verschoben, so daß das FAD fluoreszieren kann, bis die Fluoreszenz ab pH 2 durch weitere Protonierung gelöscht wird.

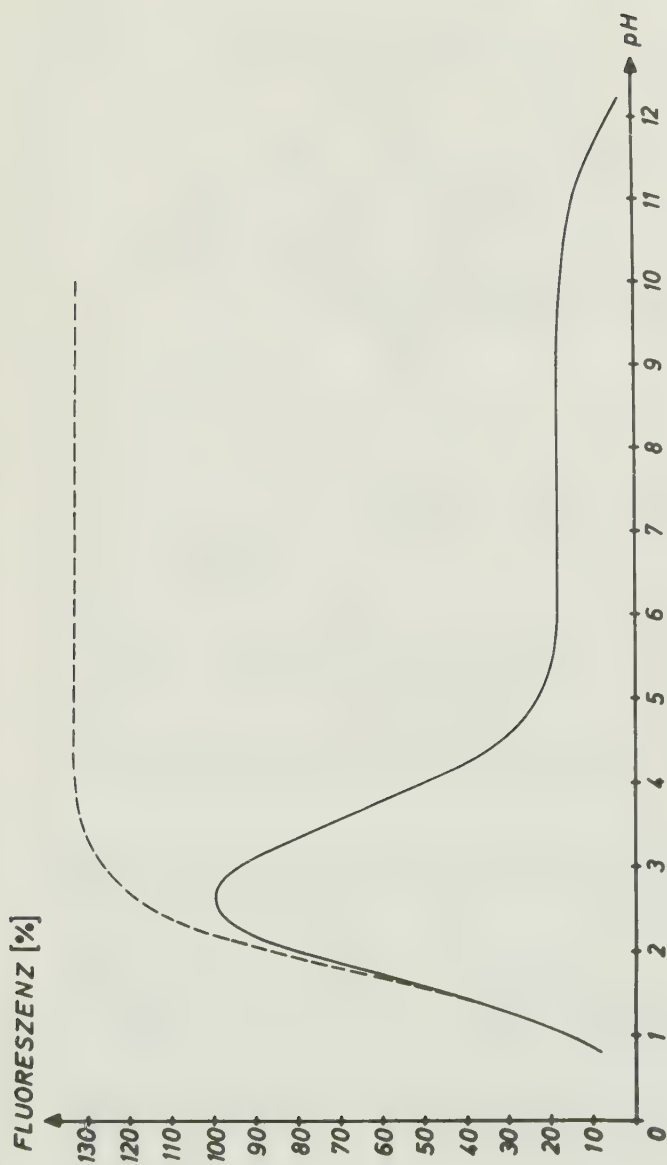


Abb. 1

FAD- und FMN-Fluoreszenz in Abhängigkeit vom pH-Wert
 FAD — — — — — FMN, Konzentration jeweils 10^{-4} mol.l $^{-1}$
 FAD-Fluoreszenz = 100 %; $\lambda_{\text{Ex}} = 470$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 525$ nm

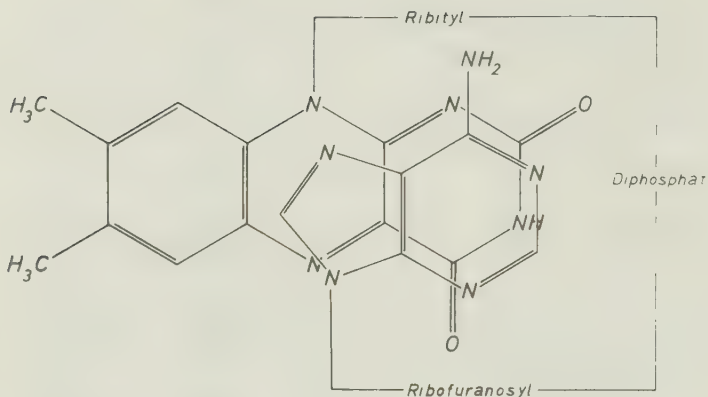


Abb. 2

Sandwichkonformation des FAD nach TSIBRIS et al. [17]

TSIBRIS, McCORMICK und WRIGHT [17] geben an, daß die heteroaromatischen Ringe im Sandwichkomplex übereinander liegen sollen. In Übereinstimmung damit berichten VOET und RICH [18] von einem Komplex aus 5'-Brom-5'-Desoxyadenosin mit Riboflavin, bei dem der Adeninring über zwei Wasserstoffbrücken mit dem uracilähnlichen Ende des Riboflavins gebunden ist.

Die Charakteristik des FMN- und des Rb-Fluoreszenzspektrums bei pH 7,5 mit den Maxima bei $\lambda_{\text{Ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Ex}} = 453 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Ex}} = 470 \text{ nm}$ und dem relativen Minimum bei $\lambda_{\text{Ex}} = 405 \text{ nm}$ findet sich wieder im FAD-Spektrum bei pH 2 bis pH 2,9. Dagegen steigen die Fluoreszenzwerte des FAD im neutralen Medium von Feinstrukturen abgesehen von $\lambda_{\text{Ex}} = 307 \text{ nm}$ bis $\lambda_{\text{Ex}} = 424 \text{ nm}$ an, und das bedeutendste relative Minimum liegt an der Stelle $\lambda_{\text{Ex}} = 450 \text{ nm}$. Das absolute Maximum wird auch hier bei $\lambda_{\text{Ex}} = 470 \text{ nm}$ erreicht.

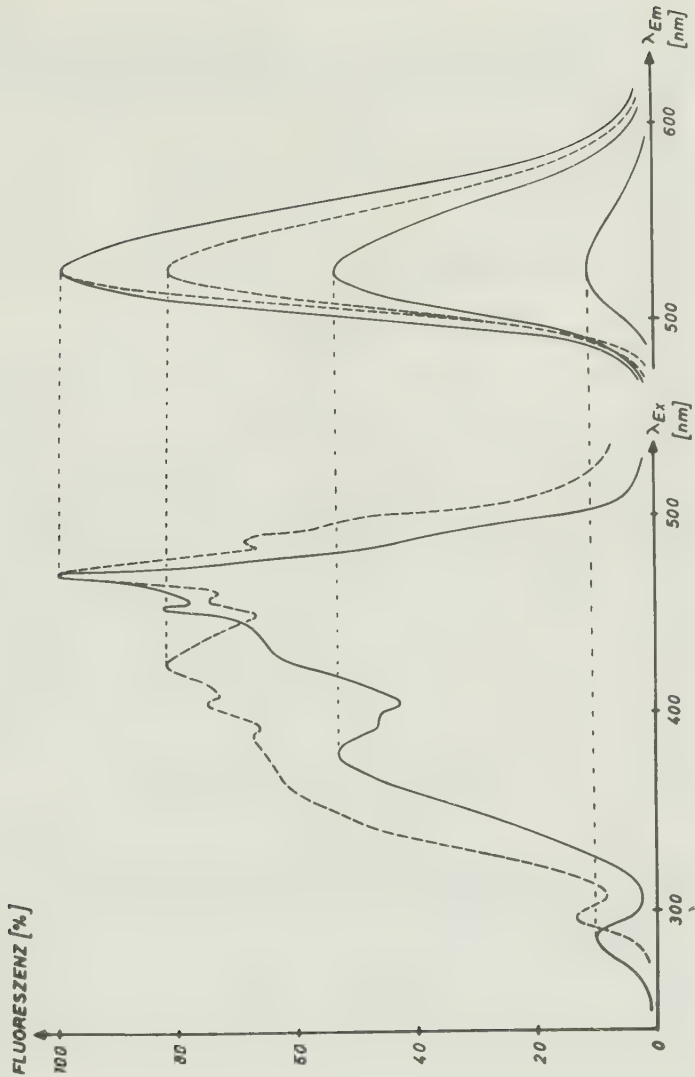


Abb. 3

Fluoreszenzspektrum des FAD, Konzentration: jeweils $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, — pH 2 bis 2,9; ---- pH 7,5;
 1. Kurve: $\lambda_{Em} = 525 \text{ nm}$, 2. Kurve: $\lambda_{Ex} = 470 \text{ nm}, 424 \text{ nm}, 380 \text{ nm}$
 und 286 nm

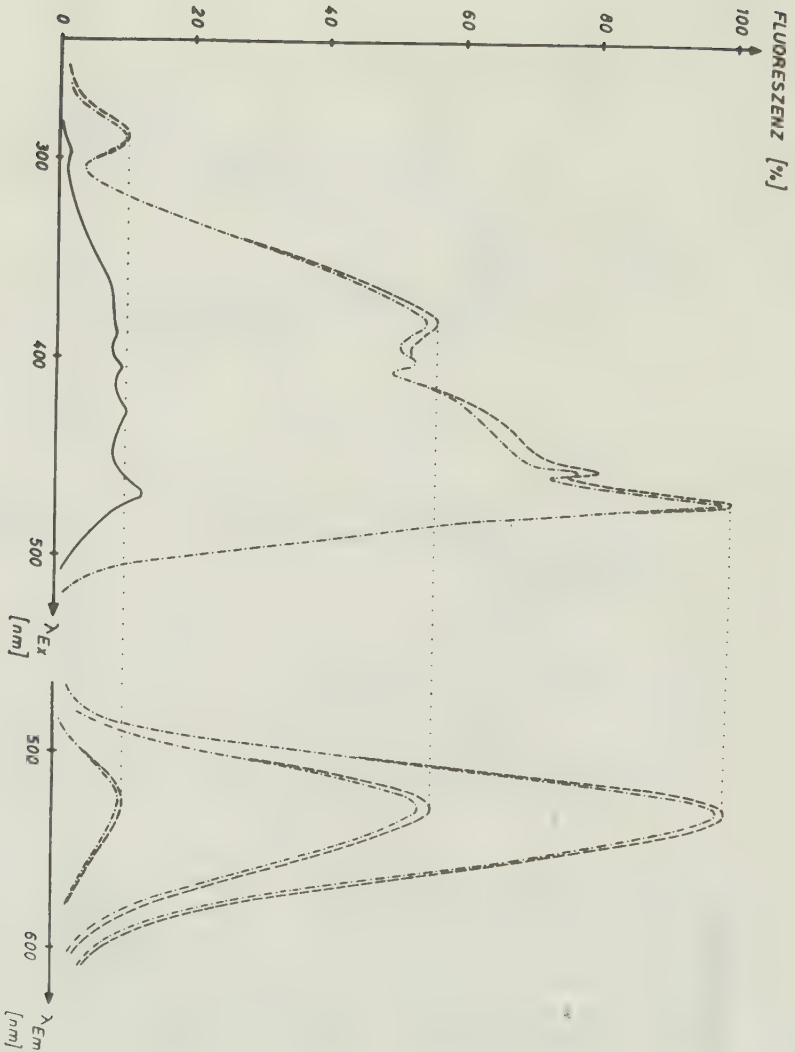


Abb. 4

Fluoreszenzspektren der Flavine, ----- FMN -.-.-.- Rb
und ————— FAD, Konzentration jeweils $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in 0,1 M
Pyrophosphatpuffer pH 7,5; 1. Kurve: $\lambda_{Em} = 525 \text{ nm}$,
2. Kurve: $\lambda_{Ex} = 469 \text{ nm}$, 380 nm und 288 nm

Da FMN und Rb keinen Sandwichkomplex bilden können, muß das FAD im saueren Bereich wegen der Übereinstimmung der Charakteristik zwischen dem FMN- und dem Rb-Spektrum einerseits und dem "sauerem" FAD-Spektrum andererseits in der offenen Form vorliegen. In diesem Zustand erreicht das FAD auch die absolut größte Fluoreszenzausbeute bei pH 2,61. Verringert sich die H_3O^+ -Konzentration, faltet sich das FAD zum Sandwichkomplex und weist in dieser Form das "neutrale" Spektrum auf.

3.2.2. UV/Vis-Spektrum

Im Gegensatz zu FMN ist FAD wegen der oben erwähnten Sandwichform in neutraler Lösung photostabil gegen Licht mit der Wellenlänge $\lambda = 600$ nm [19]. Die beobachtete Rotverschiebung des FAD-UV/Vis-Spektrums (hydrophobes Spektrum), wie sie GERSTNER an der Oxynitrilase im Vergleich zu FAD in wäßriger Lösung nachgewiesen hat [2], erklärt sich nach HEMMERICH, VEEGER und WOOD [20] ebenfalls durch die innermolekulare Sandwichbindung zwischen dem Isalloxazinteil und dem Adeninteil. Diese Erscheinung tritt im neutralen Bereich im Vergleich mit FMN und Rb deutlich hervor.

Tabelle 1

Extinktionskoeffizienten ϵ von FAD, FMN und Rb in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 nach KOZIOL [19]

λ in nm	ϵ in $10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$		
	FAD	FMN	Rb
263	38,0		
266		31,8	32,5
273		10,4	10,6
275	9,3		
445		12,5	12,5
450	11,3		

Dagegen löst sich im saueren Bereich der Sandwichkomplex wieder auf, so daß bei pH 2,6 hinsichtlich der Rotverschiebung kaum ein Unterschied zwischen FAD einerseits und FMN und Rb andererseits festzustellen ist.

3.3. Fluoreszenzeigenschaften der Oxynitrilase

Mit Hilfe empfindlicherer Meßmethoden als bei BECKER [3] konnte auch am nativen Enzym Fluoreszenz nachgewiesen werden, und zwar erreicht die Fluoreszenz der Oxynitrilase bei pH 7,5 etwa 9 % der FAD-Fluoreszenz. Im Vergleich zum FAD weist die Oxynitrilase das "sauere" Fluoreszenzspektrum, wie es am FAD sonst im Bereich pH 2 bis pH 2,9 zu beobachten ist, auf, wenngleich auch die Ausprägung des 470 nm-Maximums fehlt. Nach den Darlegungen des Abschnitts 3.2.1. muß daher die Fluoreszenz des Enzyms über die offene Form des FAD erfolgen.

WEBER gibt an, daß bislang kein fluoreszierender Aromaten-FAD-Komplex bekannt sei [21], und BARMANN und TOLLIN [22] berichten von der besonderen Affinität des FAD zu Tryptophan und Tyrosin bei gleichzeitiger Fluoreszenzlöschung, so daß die wesentlich verminderte Fluoreszenz der Oxynitrilase gegenüber dem freien FAD ihre Erklärung in der Ausbildung eines Gleichgewichtes zwischen der offenen Form des FAD und einem Charge-transfer-Komplex zwischen FAD und dem Protein findet. Solch ein Charge-transfer-Komplex liegt offenbar auch vor, wenn die Fluoreszenz des Enzyms durch Zugabe von Benzaldehyd zusätzlich vermindert wird [23]. Dagegen ist die Anwesenheit von Wasser als eine wichtige Voraussetzung zur Fluoreszenz anzusehen [4].

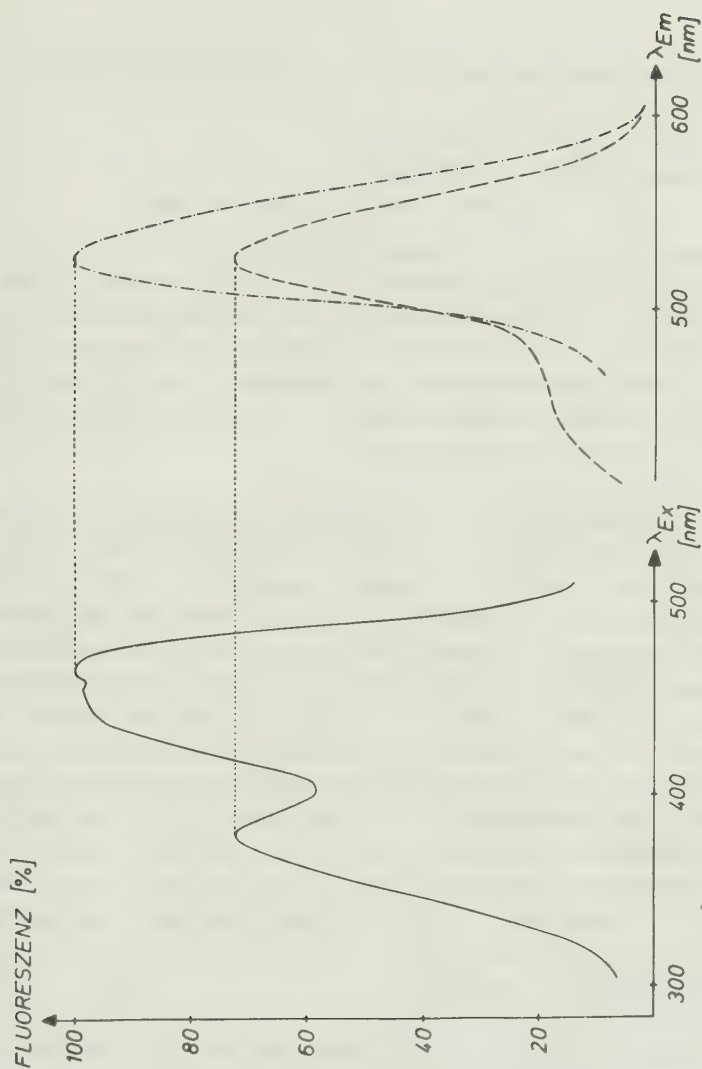


Abb. 5

Fluoreszenzspektrum der Oxynitrilase, Konzentration:

$5,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5;

1. Kurve: $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$, 2. Kurve: $\lambda_{\text{Ex}} = 464 \text{ nm}$ und 375 nm

3.4. Meßergebnisse

3.4.1. pH-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion

Die Spaltung des Enzyms sollte grundsätzlich nach der Reaktionsgleichung

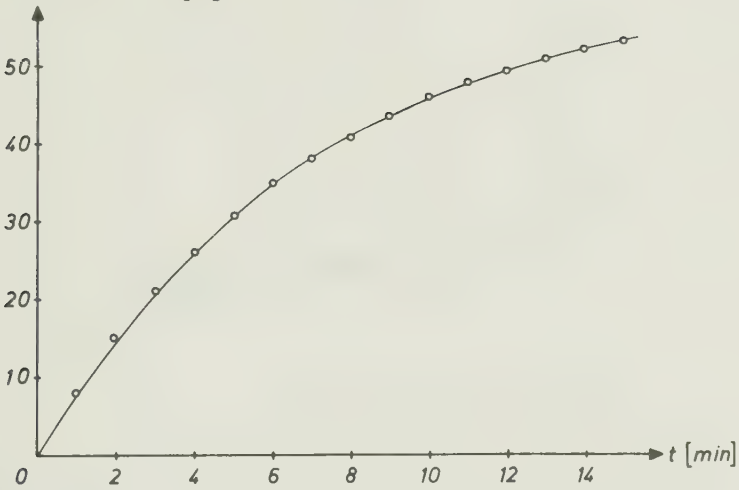


verlaufen. Der stöchiometrische Faktor q stellte sich bei den weiteren Untersuchungen als $q = 1$ heraus (vergl. Abschnitt 6.2.). Insbesondere in dem für die Spaltung gewählten saueren pH-Bereich kann die Resynthese als Rückreaktion für die ersten sechs Minuten vernachlässigt werden, und die Spaltung verläuft innerhalb dieser Zeit auch erwartungsgemäß wie eine Reaktion erster Ordnung.

Je niedriger der pH ist, desto schneller spaltet sich das FAD vom Apoprotein. In dieser Hinsicht unterscheiden sich Iso 1, Iso 2 und Iso 3 weder untereinander noch im Vergleich zum Holoenzym. Obendrein streuen die Meßwerte nur innerhalb des erlaubten Fehlerbereiches, so daß die Geschwindigkeitskonstanten für die Spaltungsreaktion über alle Meßreihen gemittelt werden können. Bildet man die arithmetischen Mittelwerte aus den gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der Spaltung für das Holoenzym und die Isoenzyme und interpoliert diese auf graphischem Wege, dann ergibt sich, daß die Geschwindigkeitskonstante k_{-1} für einen pH-Wert größer als 1,78 in wesentlich bescheidenerem Ausmaß ansteigt als im Bereich $\text{pH} < 1,78$. Aus Abb. 7a läßt sich als Mittelwert für die Spaltung bei pH 2,6 und 20 °C die Geschwindigkeitskonstante $k_{-1} = 9,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ermitteln.

BARMAN und TOLLIN [22] errechnen für die Spaltung des FMN-haltigen Enzyms Azotobacter-Flavodoxin bei 24 °C als Geschwindigkeitskonstante $k_{-1} = 8,1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Bei jeweils 24 °C liegen beide Werte etwa um den Faktor 6,5 auseinander.

FLUORESZENZ [%]



$\ln \frac{a_0}{a_0 - f(t)} = k \cdot t$

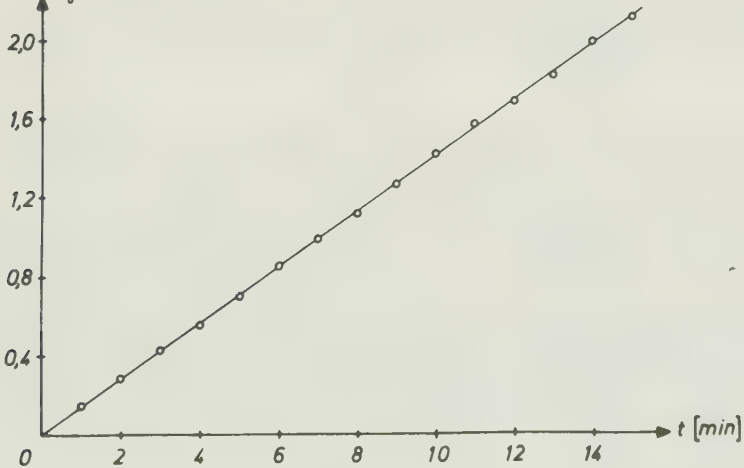


Abb. 6

Spaltung der Oxynitrilase bei pH 2,0 und 20 °C,
Konzentration $4,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; 100 %-Wert entspricht der
Anzeigegrenze des Meßgerätes



Abb. 7a

Spaltung der Oxynitrilase in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 20 °C
 ○ — ○ HOLO, ● — ● Iso 1, x — x Iso 2,
 + — + Iso 3

Zur Untersuchung des Protoneneinflusses auf die Spaltung dient eine Darstellung von $\ln k_{-1}$ gegen $\lg [H_3O^+]$ (Abb. 7b). Oberhalb pH 1,78 erweist sich die Abhängigkeit von $\ln k_{-1}$ gegenüber dem pH-Wert als linear, über den Verlauf unterhalb pH 1,78 hingegen ist eine Aussage schwieriger zu machen, da nur wenige Meßpunkte vorliegen. Es soll aber der Einfachheit halber ebenfalls eine lineare Abhängigkeit angenommen werden. Bei einer Zerlegung der Kurve aus Abb. 7b in zwei Geraden ergeben sich aus den experimentellen Daten die Geraden Gleichungen

$$g_1: \ln k_{-1} = 0,55 \cdot \lg [H_3O^+] - 3,65 \quad (7)$$

$$\text{und} \quad g_2: \ln k_{-1} = 3,2 \cdot \lg [H_3O^+] + 7,4 \quad (8)$$

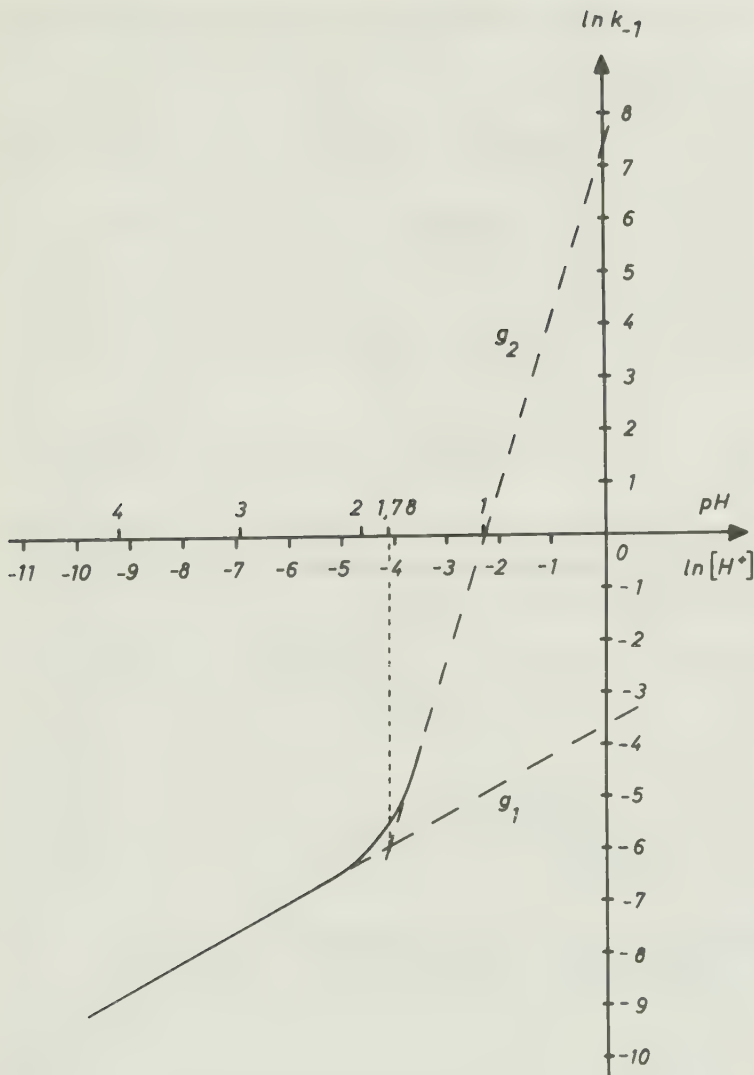


Abb. 7b

Spaltung der Oxynitrilase in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 20 °C, Ausgleichskurve aus den Mittelwerten der Spaltungskurven von HOLO, Iso 1, Iso 2 und Iso 3

Die Geraden haben den gemeinsamen Schnittpunkt an der Stelle $\text{pH} = 1,78$. Löst man beide Gleichungen nach k_{-1} auf, dann ergibt sich gemäß Gleichung (7)

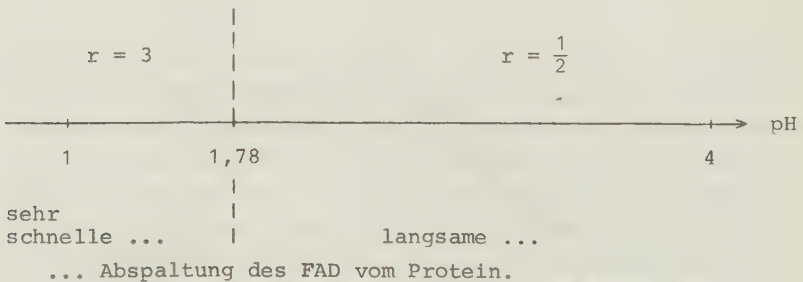
$$\begin{aligned} k_{-1} &= [\text{H}_3\text{O}^+]^{0,55} \cdot e^{-3,65} \\ &\approx 3 \cdot 10^{-2} \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]^{\frac{1}{2}} \end{aligned} \quad (9)$$

Gleichung (8) liefert

$$\begin{aligned} k_{-1} &= [\text{H}_3\text{O}^+]^{3,2} \cdot e^{7,4} \\ &\approx 2 \cdot 10^3 \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]^3 \end{aligned} \quad (10)$$

Unterhalb $\text{pH} 1,78$ geht die H_3O^+ -Konzentration in der dritten Potenz ein, dagegen wirken sich oberhalb $\text{pH} 1,78$ die Hydro-niumionen nur noch geringfügig aus.

Einfluß der H_3O^+ -Konzentration auf k_{-1} mit der Ordnung r



3.4.2. Temperaturabhängigkeit der Spaltungsreaktion

Nicht ganz so einheitlich wie bei der pH-Abhängigkeit stellt sich die Temperaturabhängigkeit der Spaltungsreaktion dar. Hierin stimmen jeweils nur das Holoenzym und Iso 1 einerseits und Iso 2 und Iso 3 andererseits überein. Erwartungsgemäß steigt die Reaktionsgeschwindigkeit bei erhöhter Temperatur an, und zwar bei Iso 2 und Iso 3 um das 1,9-fache und bei HOLO und Iso 1 um das 2,3-fache bei einer jeweiligen Temperaturerhöhung um 10 °C (Abb. 8). (Eine ausführliche Behandlung thermodynamischer Größen erfolgt in Kapitel 5.)

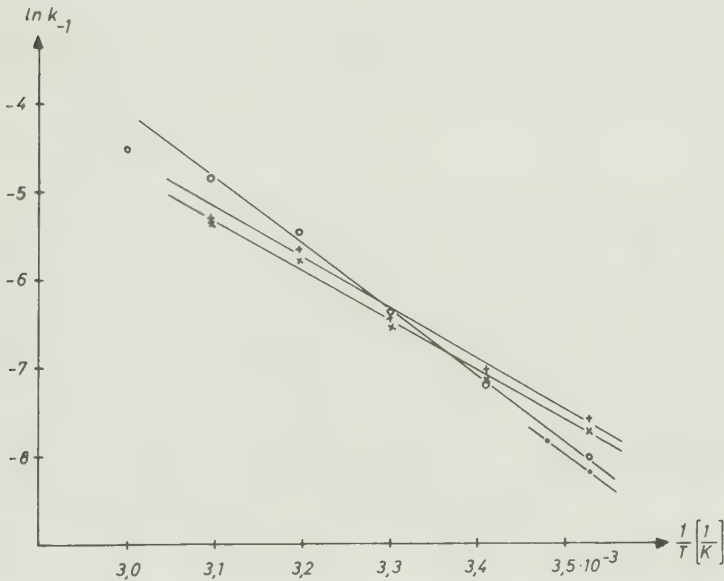


Abb. 8

Spaltung von o ——— o HOLO, • ——— • Iso 1,
x ——— x Iso 2 und + ——— + Iso 3 in Abhängigkeit
von der Temperatur bei pH 2,6

3.4.3. UV-Spektrum zur Spaltung

Verfolgt man die Spaltung der Oxynitrilase anhand eines UV-Spektrums, dann erkennt man einen kontinuierlichen Anstieg der 220 nm-Bande und eine Angleichung des UV-Spektrums an das völlig ungegliederte Spektrum des Apoproteins.

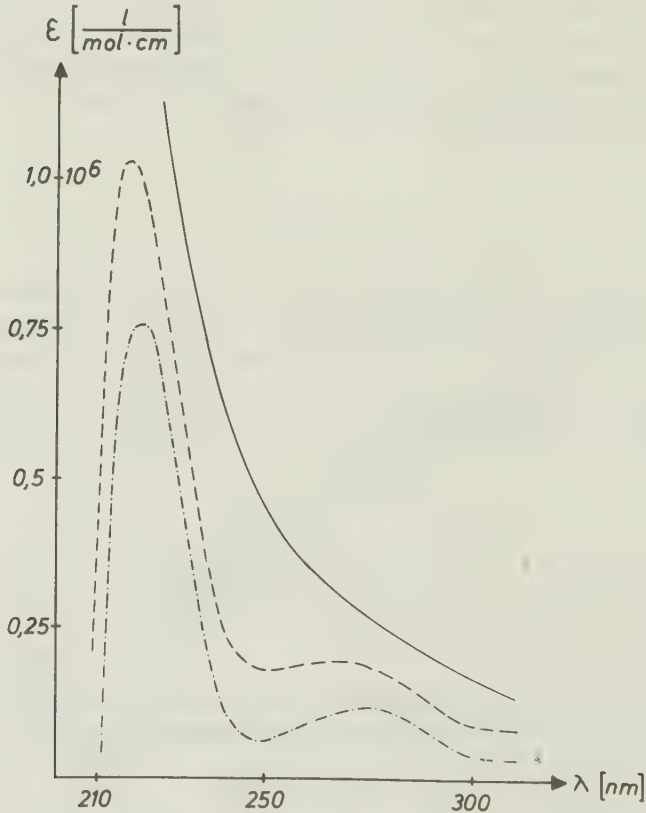


Abb. 9

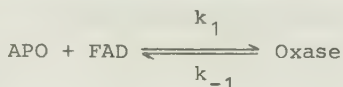
UV-Spektrum der Oxynitrilase - - - - - 2 min und - - - - - 100 min nach Spaltungsbeginn und ——— APO;

Konzentrationen jeweils $1,43 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in 0,3 M Acetatpuffer pH 2 bei 20°C

4. Resynthese

4.1. Vorbemerkungen

Im Abschnitt 3.1. und bereits früher [8], [9] wurde auf die Reversibilität der Spaltung und Resynthese der Oxynitrilase hingewiesen. Verständlicherweise hängt jedoch bei der reversiblen Reaktion



die Lage des Gleichgewichtes ganz wesentlich vom vorgegebenen pH-Wert ab, die Reversibilität setzt sogar einen bestimmten pH-Bereich voraus. Ist das Medium zu sauer (etwa pH 1,5), so läßt sich eine beträchtliche Denaturierung des Proteins beobachten. Im alkalischen Bereich setzt bei pH > 11,4 ebenfalls eine Spaltung des Enzyms ein [4], bei der ein großer Teil des Proteins denaturiert und für eine Resynthese nicht mehr zur Verfügung steht.

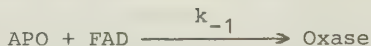
Wählt man einen pH-Bereich von etwa 4 bis 7,5, dann läßt sich das Apoprotein zumindest kurzfristig vor Denaturierung schützen und mit FAD wieder zum nativen Enzym resynthetisieren. Um brauchbare Reaktionsgeschwindigkeiten zu erhalten, wurde die Resynthese im allgemeinen bei pH 7,5 durchgeführt und die Spaltung bei pH < 4,5. Spaltungs- und Resynthesebedingungen, wie sie bei TEIPEL und KOSHLAND [24] beschrieben werden, bei denen die durch 6 M Guanidinhydrochlorid bewirkte Spaltung lediglich durch Verdünnung rückgängig gemacht wird, sind für die Resynthese der Oxynitrilase ungeeignet.

4.2. Fluorimetrische Ergebnisse

Analog zur Spaltung der Oxynitrilase wurde auch hier die Änderung der FAD-Fluoreszenz während der Resynthese verfolgt. Dabei gilt die Abnahme der Fluoreszenz als Maß für die Konzentrationsabnahme an freiem FAD.

4.2.1. Reaktionsordnung der Resynthese

Unter der Annahme, die Resynthese laufe gemäß der Reaktionsgleichung



vollständig ab, wäre zu vermuten, daß der Reaktionsablauf der zugehörigen Geschwindigkeitsgleichung

$$v = - \frac{df}{dt} = k_1 \cdot a \cdot f \quad (11)$$

mit $a = [\text{APO}]$ zur Zeit t
 $f = [\text{FAD}]$ zur Zeit t

gehört, so daß die Resynthese eine Reaktion zweiter Ordnung sein muß. Demgegenüber läßt sich aber ein Fluoreszenzabfall feststellen, der nicht gegen Null strebt, sondern sich auf ein wesentlich höheres Niveau einstellt. Zwar kann eine gewisse Restfluoreszenz des eingesetzten Apoproteins (siehe Abschnitt 5.1.1.) wie die Eigenfluoreszenz des Adduktes nicht ganz ausgeschlossen werden, jedoch quantitative Überlegungen nach Abschnitt 3.3. und aufgrund der Steigung der Fluoreszenzkurve erlauben nicht, die relativ hohe Fluoreszenz allein durch diese beiden Störfaktoren zu erklären.

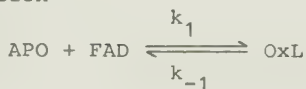
Gleichung (11) setzt voraus, daß man die zugehörige Rückreaktion vernachlässigen darf, was aber hier offenbar nicht der Fall ist. Unter dieser Annahme führt die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_1 über den üblichen Ansatz gemäß Gleichung (11) nicht zum Ziel, denn die Hinreaktion läuft nicht vollständig ab, es bildet sich vielmehr ein Gleichgewichtszustand aus.

Ein von HOFMANN [25] vorgeschlagener Ansatz für eine Reaktion erster Ordnung läßt sich auf eine Reaktion zweiter Ordnung abändern:

Es sei:

$$\begin{aligned} a_0 &= \text{APO zur Zeit } t = 0 \\ a &= \text{APO zur Zeit } t \\ f_0 &= \text{FAD zur Zeit } t = 0 \\ f &= \text{FAD zur Zeit } t \\ e &= \text{Oxase zur Zeit } t \\ \bar{e} &= \text{Oxase im Gleichgewichtszustand} \end{aligned}$$

Für die Reaktion



gilt dann

$$\frac{de}{dt} = k_1 (a_0 - e) (f_0 - e) - k_{-1} e \quad (12)$$

Da die Umsetzungsgeschwindigkeit im Gleichgewichtszustand Null ist, läßt sich k_{-1} über

$$k_1 (a_0 - \bar{e}) (f_0 - \bar{e}) = k_{-1} \bar{e}$$

ausdrücken als

$$k_{-1} = \frac{k_1 (a_0 - \bar{e}) (f_0 - \bar{e})}{\bar{e}}$$

woraus sich die Geschwindigkeitsgleichung

$$\frac{de}{dt} = \frac{k_1}{\bar{e}} (a_0 f_0 - \bar{e} e) (\bar{e} - e) \quad (13)$$

ergibt. Diese Differentialgleichung läßt sich mittels Partialbruchzerlegung integrieren, und man erhält

$$k_1 \cdot t = \frac{\bar{e}}{a_0 f_0 - \bar{e}^2} \ln \frac{a_0 f_0 \bar{e} - \bar{e}^2 e}{a_0 f_0 \bar{e} - a_0 f_0 e} \quad (14)$$

oder wenn man

$x(t)$ = Fluoreszenz zur Zeit t

x_0 = Fluoreszenz zur Zeit $t = 0$

setzt,

FLUORESCENZ [%]

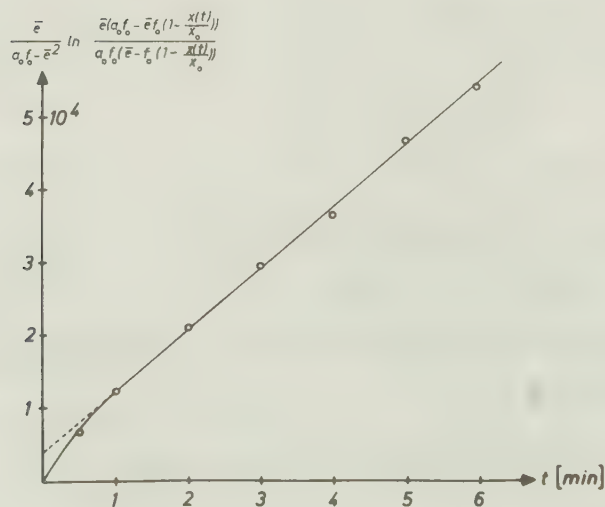
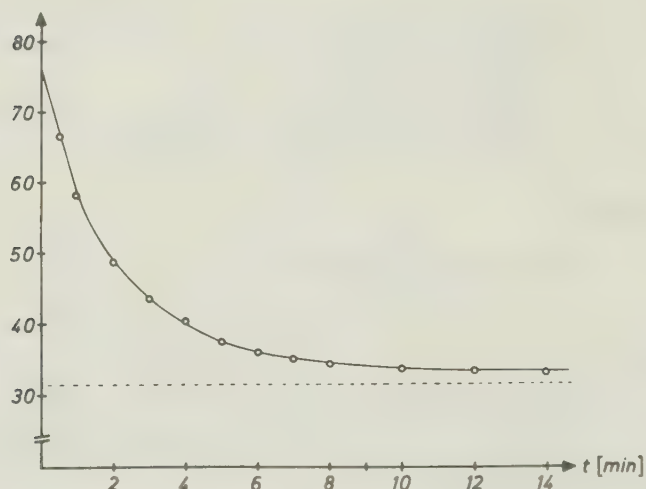


Abb. 10

Resynthese der Oxynitrilase aus $2,9 \cdot 10^{-5}$ M APO und $1,9 \cdot 10^{-5}$ M FAD in 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 bei 20 °C;
100 %-Wert entspricht der Anzeigegrenze des Meßgerätes

$$k_1 \cdot t = \frac{\bar{e}}{a_o f_o - \bar{e}^2} \ln \frac{\bar{e} \left(a_o f_o - \bar{e} f_o \left(1 - \frac{x(t)}{x_o} \right) \right)}{a_o f_o \left(\bar{e} - f_o \left(1 - \frac{x(t)}{x_o} \right) \right)} \quad (15)$$

Trägt man nun die verschiedenen Werte

$$\frac{\bar{e}}{a_o f_o - \bar{e}^2} \ln \frac{\bar{e} \left(a_o f_o - \bar{e} f_o \left(1 - \frac{x(t)}{x_o} \right) \right)}{a_o f_o \left(\bar{e} - f_o \left(1 - \frac{x(t)}{x_o} \right) \right)}$$

in einem Diagramm gegen t auf, dann erhält man eine Gerade mit der Steigung k_1 . Wenn die Resynthesereaktion in gleicher Darstellung wie nach Gleichung (15) ebenfalls eine Gerade ergibt, dann gilt sie als eine Reaktion zweiter Ordnung. Dies ist nach den Meßergebnissen offensichtlich auch der Fall (Abb. 10). Die Abweichung der Kurve von der Geraden innerhalb der ersten Minute ist offenbar auf eine Meßungenauigkeit zurückzuführen.

4.2.2. pH-Abhängigkeit der Resynthese

Betrachtet man die Meßkurven von Iso 2, Iso 3 und HOLO in Abhängigkeit vom pH-Wert, dann fällt für alle Proben die völlig gleichförmige Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Lediglich die Absolutwerte für k_1 bzw. deren Logarithmen differieren voneinander, jedoch bleiben die Unterschiede auch hier wie bei der Spaltung innerhalb der Fehlergrenzen. Die Bildung einer gemeinsamen Kurve aus den arithmetischen Mittelwerten der drei Meßkurven ist deshalb zulässig. Im Verlauf dieser Mittelwertkurve zeigt sich ein Anstieg der Resyntheseausbeute sowohl vom sauren als auch vom alkalischen Bereich her bis hin zum pH 7,3. Oberhalb pH 7,3 bewirkt die Deprotonierung eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit und unterhalb pH 7,3 eine Erhöhung.

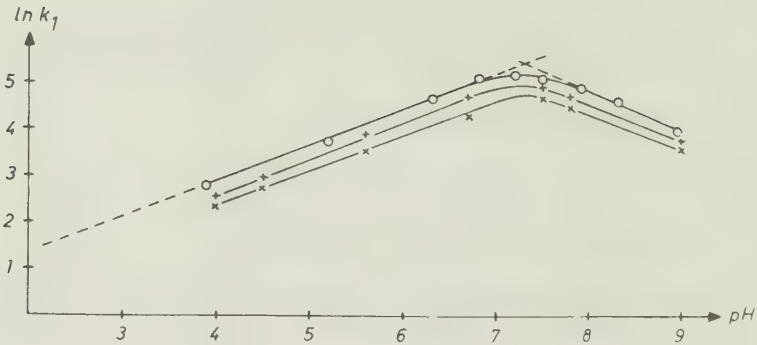


Abb. 11a

Resynthese von o — o HOLO, + — + Iso 2 und
x — x Iso 3 in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 20 °C

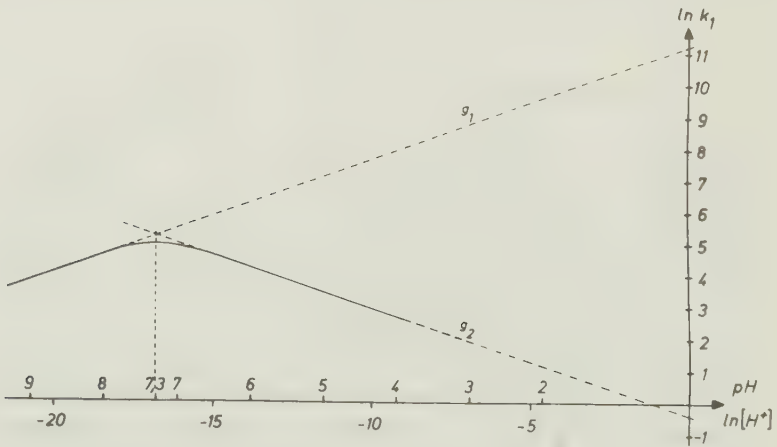


Abb. 11b

Resynthese der Oxynitrilase in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 20 °C, Ausgleichskurve aus den Mittelwerten der Resynthesekurven der Abb. 11a

Stellt man die Resynthesekurve aus den gemittelten und graphisch ausgeglichenen Mittelwerten als Funktion von $\ln k_1$ gegen $\ln [\text{H}_3\text{O}^+]$ dar, dann ergibt sie sich ähnlich wie bei der Spaltung als Kurve aus zwei Geraden g_1 und g_2 , die sich bei der Resynthese an der Stelle $\text{pH} = 7,3$ schneiden.

g_1 bildet den linken Ast der Kurve und besitzt die Funktionsgleichung

$$g_1: \ln k_1 = 0,355 \cdot \ln [\text{H}_3\text{O}^+] + 11,2 \quad (16)$$

und g_2 mit der Funktionsgleichung

$$g_2: \ln k_1 = -0,33 \cdot \ln [\text{H}_3\text{O}^+] - 0,38 \quad (17)$$

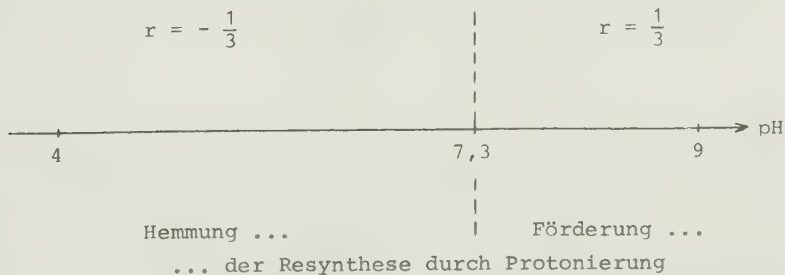
bildet den rechten Ast der Kurve. Aus Gleichung (16) folgt

$$\begin{aligned} k_1 &= [\text{H}_3\text{O}^+]^{0,355} \cdot e^{11,2} \\ k_1 &\approx 7 \cdot 10^4 \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]^{\frac{1}{3}} \end{aligned} \quad (18)$$

Entsprechend liefert Gleichung (17)

$$\begin{aligned} k_1 &= [\text{H}_3\text{O}^+]^{-0,33} \cdot e^{-0,38} \\ k_1 &\approx 0,7 \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]^{-\frac{1}{3}} \end{aligned} \quad (19)$$

Einfluß der H_3O^+ -Konzentration auf k_1 mit der Ordnung r



4.2.3. Temperaturabhängigkeit der Resynthese

Ganz so uneinheitlich wie die Spaltung gibt sich die Temperaturabhängigkeit der Resynthese nicht. Iso 3 und HOLO unterscheiden sich zwar am stärksten, doch liegen diese Unterschiede noch im zulässigen Fehlerbereich, während sich die Geschwindigkeitskonstanten für Iso 2 zwischen denen von Iso 3 und HOLO bewegen.

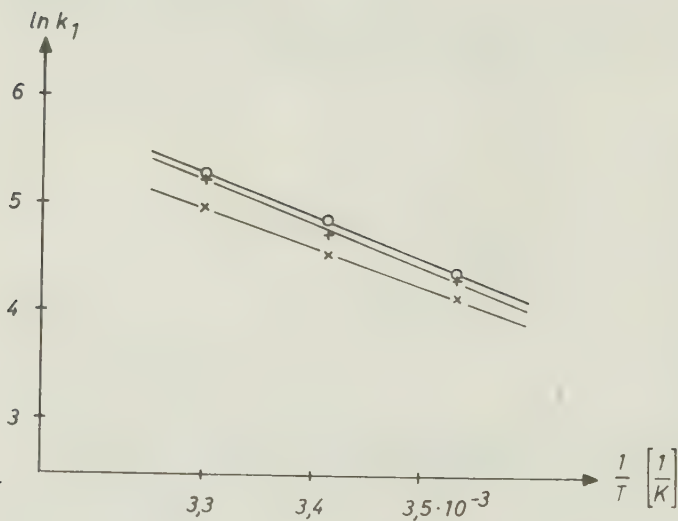


Abb. 12

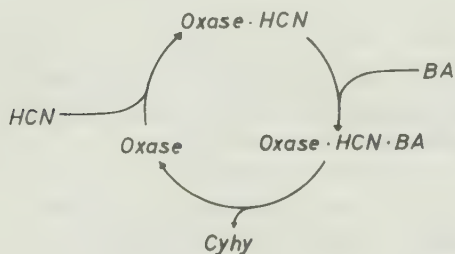
Resynthese von o—o HOLO, +—+ Iso 2 und x—x Iso 3 in Abhängigkeit von der Temperatur bei pH 7,5.

4.3. Polarimetrische Ergebnisse

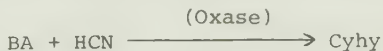
4.3.1. Standardmessung

Nach dem Modell zur Spaltung und Resynthese der Oxynitrilase soll sich das Resynthesezwischenprodukt Komb aus der ersten Teilreaktion vollends zum nativen Enzym zurückbilden. Wie noch gezeigt wird, ist dieses Reaktionsprodukt Komb nicht identisch mit dem Holoenzym, denn ersterem fehlt jegliche katalytische Aktivität. Die enzymatische Wirksamkeit des Resyntheseproduktes aus FAD und APO läßt sich polarimetrisch über die Bildung des optisch aktiven Cyanhydrins (Cyhy) aus Benzaldehyd (BA) und Blausäure nachweisen.

Als Verfahren dazu dient der von KISSLINGER [11] verfeinerte Standarddrehtest. Er wird im praktischen Teil Abschnitt 12.2. beschrieben. Nach KISSLINGER wird zunächst HCN am Enzym fixiert und unter weiterer Aufnahme von Benzaldehyd der Oxase·HCN·BA-Komplex gebildet, der unter Rückbildung von Oxynitrilase optisch aktives Cyanhydrin freisetzt.



Die Rückspaltung des gebildeten Mandelsäurenitrils in Benzaldehyd und Blausäure kann vernachlässigt werden.



4.3.2. Aktivitätsvergleich zwischen dem Holoenzym und seinen Isoenzymen

Die Aktivität des Enzymgemisches ergibt sich nicht als mittlerer Aktivitätswert aller Aktivitäten der einzelnen Isoenzyme, vielmehr liegt das katalytische Potential jedes einzelnen Isoenzym unter dem des Enzymgemisches. Die geringste Aktivität weist Iso 1 auf mit einem Aktivitätsabfall von etwa einem Drittel gegenüber dem Holoenzym. Die Wirksamkeit von Iso 3 reicht an die Aktivität des Holoenzym heran, und die Wirksamkeit von Iso 2 liegt zwischen denen von Iso 1 und Iso 3. (Dabei ist sichergestellt, daß die Aktivitätsunterschiede der Isoenzyme nicht die Folge unterschiedlicher Reinheit sein können.) Dieser Befund läßt aufgrund ähnlicher Beobachtungen an Multienzymkomplexen eine gemeinsame Quartärstruktur der Isoenzyme vermuten, denn sofern bei der Assoziation einzelner Enzyme zu einem Multienzymkomplex eine Änderung der spezifischen Aktivität der betreffenden Enzyme überhaupt eintritt, ließ sich bisher stets eine Aktivitätszunahme, aber niemals eine Aktivitätseinbuße beobachten [26].

Tabelle 2

Anfangsgeschwindigkeit der Cyanhydrinsynthese als Maß der Enzymaktivitäten des Holoenzym und der Isoenzyme. Gemessen nach dem Standarddrehtest. Konzentrationen jeweils $1,4 \cdot 10^{-5}$ M in 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5

	v_o in $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
HOLO	1,4
Iso 1	0,92
Iso 2	1,1
Iso 3	1,3

4.3.3. Zeitabhängigkeit der katalytischen Aktivität

Gibt man frisch bereitetes Apoenzym in die FAD-Lösung, so lagern sich die beiden Reaktionspartner unter Fluoreszenzabfall auf etwa 40 % der Ausgangsfluoreszenz spontan zusammen. Das Resyntheseprodukt "Komb" ist aber noch nicht katalytisch wirksam. 10 min nach Resynthesebeginn läßt sich noch keine Katalysewirkung feststellen. Zwischen 15 min und 20 min streuen die gemessenen Drehwinkel um die Signifikanzgrenze, welche sich aus der Meßungenauigkeit des Polarimeters und einer geringen Restaktivität von nicht vollständig abgetrenntem Holoenzym bei der Apoproteinherstellung herleitet. (Auf die Darstellung des Apoproteins und die Lage des Resynthesespaltungs-Gleichgewichtes wird in Kapitel 5 und im praktischen Teil eingegangen.) Erst 20 min nach Resynthesebeginn wird die katalytische Aktivität des Resyntheseproduktes eindeutig.

Die Aktivität steigt in der ersten Stunde auf über die Hälfte ihres Endwertes an. Von dieser Zeit an nehmen die Aktivitätswerte nach einer neuen, flacheren Wachstumsfunktion zu und erreichen nach vier Stunden den Zweidrittelwert ihrer Endaktivität. Nach etwa zweieinhalb Tagen wird die größte katalytische Wirksamkeit beobachtet, denn nun setzt bereits die Denaturierung in nennenswertem Umfang ein.

Bezogen auf die eingesetzte Menge Apoprotein erreicht das resynthetisierte Enzym eine Endaktivität von 91 % des Ausgangswertes. Ohne den Denaturierungseffekt wäre mit 97 % nach sechs Tagen ein weit höherer Wert zu erwarten.

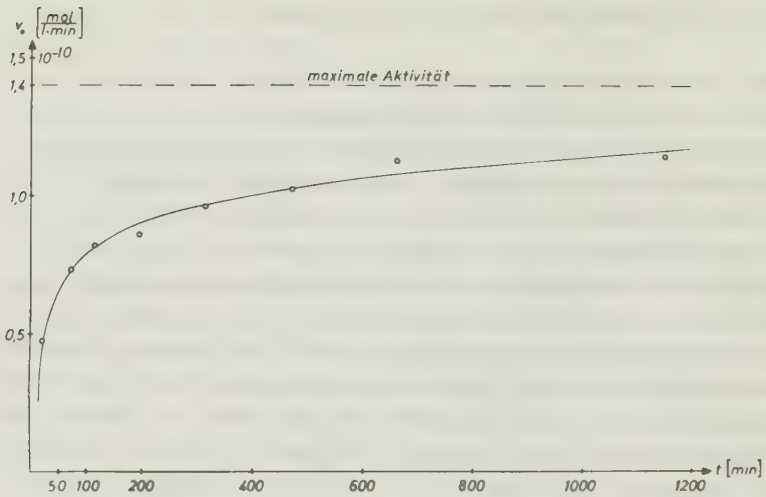


Abb. 13a

Aktivitätsänderung des Resyntheseproduktes, gemessen nach dem Standarddrehtest

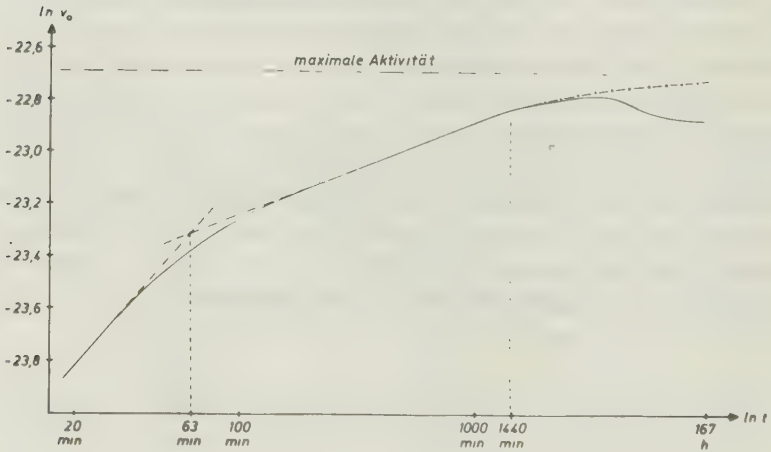


Abb. 13b

Aktivitätsänderung des Resyntheseproduktes; - - - - - theoretischer Kurvenverlauf ohne Denaturierung (berechnet aus der Steigung der Kurve in Abb. 13a)

4.3.4. Inhibitorversuche

Wenn sich das FAD an das Apoprotein anlagert, dann wird es nicht sofort in seiner endgültigen Lage an das Protein gebunden. Gegen solch eine endgültige Fixierung spricht der Befund, daß das aktive Zentrum 20 min braucht, um die Synthese des optisch aktiven Cyanhydrins bewirken zu können.

Die wichtigsten Bindungsstellen des FAD sollten der Adeninteil, der Isalloxazinteil und die Diphosphatgruppe sein. Die Bedeutung dieser Bindungsstellen ließe sich nachweisen, wenn es gelänge, über eine Konkurrenzreaktion mit beispielsweise Adenin, Riboflavin oder ADP das FAD in seiner Affinität zum Protein zu beeinträchtigen. Zum mindesten sollte dabei eine Verlangsamung der Resynthese, günstigstenfalls sogar eine Blockierung derselben eintreten [27].

Wie aus Vorversuchen hervorging, sind "Resyntheseprodukte" aus Apoprotein und den nachfolgend aufgeführten Inhibitoren nicht in der Lage, ähnlich dem Holoenzym optisch aktives Mandelsäurenitril zu bilden. Überdies gibt es auch sonst keine Beobachtungen über Anlagerungsprodukte aus FMN, Rb und den anderen Inhibitoren mit Apoprotein.

Im einzelnen wurden Resyntheseversuche unter Einsatz an folgenden Inhibitoren durchgeführt:

Flavinmononucleotid	FMN
Riboflavin	Rb
Adenosintriphosphat	ATP
Adenosindiphosphat	ADP
Adenosinmonophosphat	AMP
Adenosin	Ado
Adenin	Ade

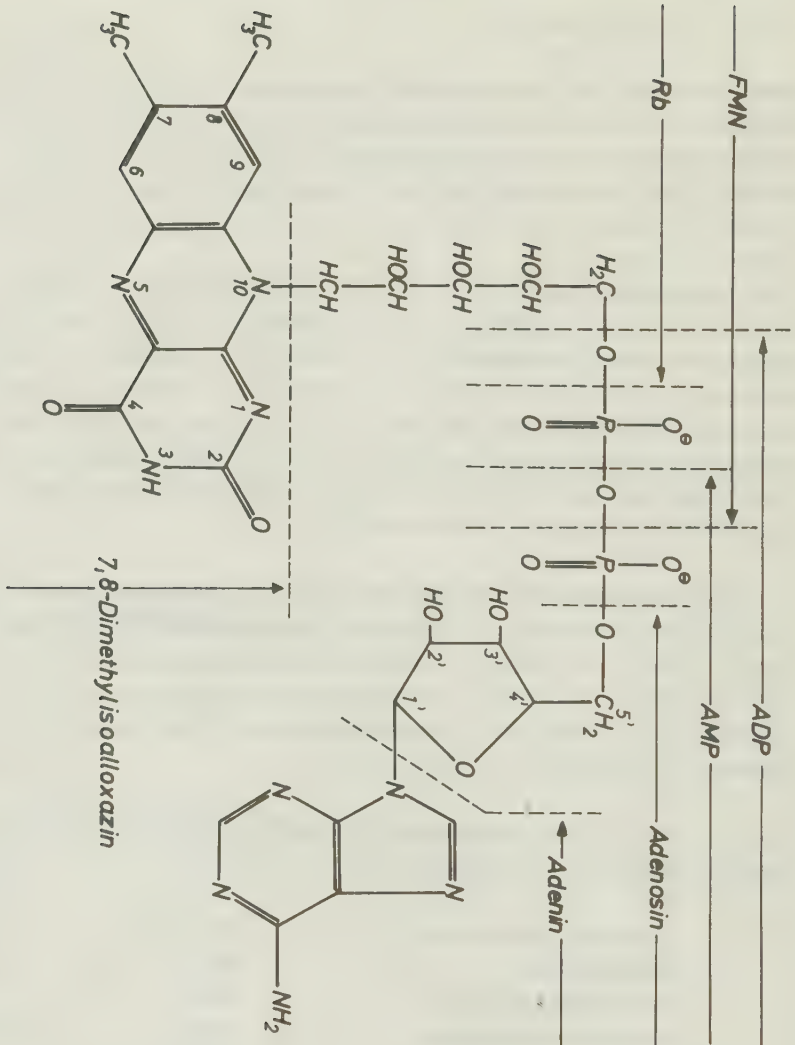


Abb. 14

Strukturformel des FAD (Numerierung der Atome nach HEMMERICH et al. [20])

4.3.4.1. Inkubationsversuche

Grundsätzlich sollte es auch möglich sein, eine Austauschreaktion zwischen FAD und einem Inhibitor am nativen Enzym ohne vorhergehende Spaltung in Gang zu setzen, sofern das FAD nicht kovalent an das Protein gebunden ist.

Bei der Inkubation der verschiedenen Enzymproben mit den jeweiligen Inhibitoren zeigte sich eine Aktivitätsminderung durch FMN auf etwa 60 % der Ausgangsaktivität. Auffällig ist hierbei der verhältnismäßig rasche Aktivitätsverlust innerhalb von drei Stunden. Im weiteren Verlauf ändert sich das katalytische Potential des Enzyms wegen der Erreichung des Gleichgewichtes zwischen FAD und FMN nicht mehr wesentlich.

Rb vermindert die katalytische Wirksamkeit ebenfalls, aber nur schwach. Alle anderen Inhibitoren beeinflussen das Enzym hinsichtlich seiner Aktivität nicht, bzw. die entsprechenden Meßwerte streuen innerhalb des Fehlerbereichs.

Tabelle 3

Anfangsgeschwindigkeit der Cyanhydrinsynthese nach unterschiedlich langer Inkubationszeit der Oxynitrilase mit Inhibitoren. Gemessen nach dem Standarddrehtest

Inhibitoren	$\begin{array}{c} v_o \\ \text{in } 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \end{array}$			
	Dauer nach Resynthesebeginn			
	1 h	3 h	8 d	11 d
ohne Inhibitor	2,6	2,6	2,5	2,6
FMN	2,0	1,7	1,6	1,5
Rb	2,3	2,2	2,2	2,2
ATP	2,0	2,5	2,6	2,6
ADP	2,7	2,5	2,6	2,6
AMP	2,6	2,6	2,4	2,5
Ado	2,6	2,6	2,6	2,4
Ade	2,6	2,5	2,5	2,6

4.3.4.2. Resyntheseversuche

Gibt man bei der Resynthese von APO und FAD noch einen Inhibitor im dreifachen Überschuß gegenüber FAD hinzu, dann wird das Ausmaß der Resynthese durch den jeweiligen Inhibitor unterschiedlich beeinträchtigt.

Bei der Resynthese auf Holoenzym-Apoprotein hemmt FMN am augenfälligsten. In diesem Falle bleibt die katalytische Aktivität 19 Stunden nach Resynthesebeginn um 25 % hinter der des Vergleichsproduktes ohne Inhibitor zurück. Ähnlich stark (20 %) mindert Rb das katalytische Potential, gefolgt von ADP mit 12 % Aktivitätseinbuße. Die Hemmwirkung von ATP ist mit 7 % nicht mehr signifikant. Ade hemmt überhaupt nicht.

Tabelle 4

Anfangsgeschwindigkeit der Cyanhydrinsynthese, katalysiert durch Resyntheseprodukte 19 h nach Resynthesebeginn in Gegenwart von Inhibitoren. Gemessen nach dem Standarddrehtest

Inhibitor	v_o in $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
ohne Inhibitor	1,8
FMN	1,4
Rb	1,4
ATP	1,7
ADP	1,6
Ade	1,8

Demgegenüber liefert die Resynthese mit dem Apoprotein des Iso 3 20 Stunden nach Resynthesebeginn leicht veränderte Resultate. Verglichen mit der Standardsynthese ohne Inhibitoren weisen auch hier FMN und Rb eine Hemmwirkung von 25 % auf, jedoch scheint ADP überhaupt keine kompetitive Hemmwirkung zu besitzen. AMP, Ado und Ade sind auch in diesem Fall erwartungsgemäß ohne Einfluß auf die katalytische Aktivität des Resyntheseproduktes.

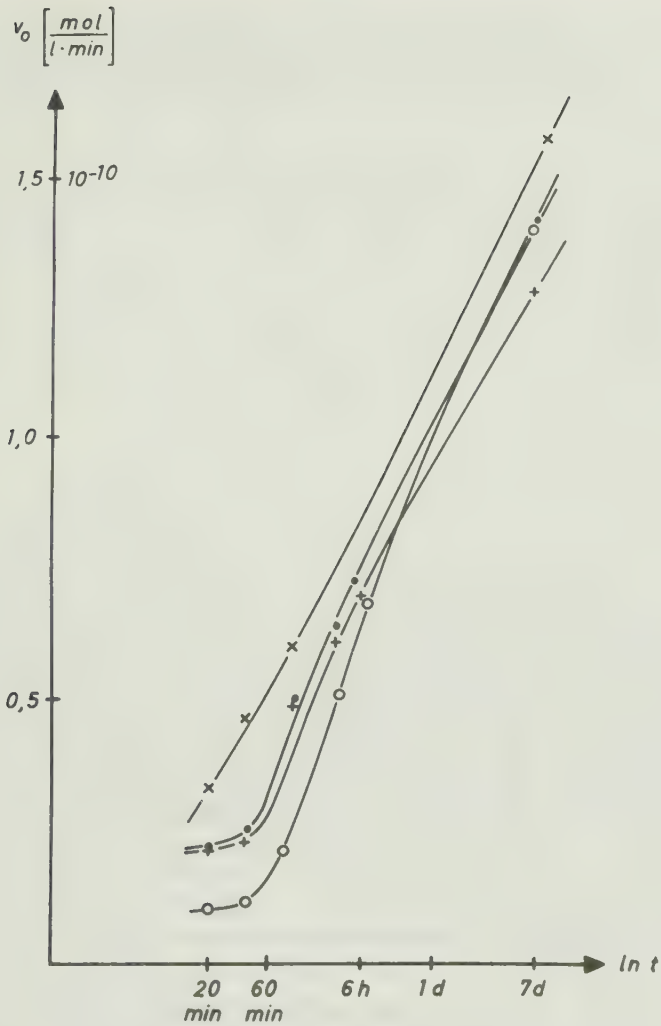


Abb. 15

Inhibitorwirkung bei der Resynthese des Iso 2, Aktivitäts-
 änderung x—x ohne Inhibitor (nur FAD), +—+ mit
 FMN, •—• mit Rb und o—o mit ADP; gemessen nach
 dem Standarddrehtest

Tabelle 5

Anfangsgeschwindigkeit der Cyanhydrinsynthese, katalysiert durch das Resyntheseprodukt aus Iso-3-Apoprotein und Inhibitoren 20 h nach Resynthesebeginn. Gemessen nach den Bedingungen des Standarddrehtests.

Inhibitor	v_o in 10^{-10} mol.l ⁻¹ .min ⁻¹
ohne Inhibitor	1,4
FMN	1,2
Rb	1,2
ATP	1,3
ADP	1,4
AMP	1,4
Ado	1,4
Ade	1,4

Das Apoprotein des Iso 2 verhält sich ähnlich wie das aus HOLO. Auch hier hemmt FMN am stärksten, während Rb und ADP gemessen an FMN nur etwa die Hälfte der Hemmwirkung entfalten. Verfolgt man allerdings die katalytische Aktivität der Resyntheseprodukte vom Resynthesebeginn an bis etwa 7 Tage, dann ändert sich das Bild über die Hemmwirkung der Inhibitoren, insbesondere bei ADP. Iso-2-Apoprotein verhält sich hier wie alle übrigen, so daß es stellvertretend in der Resynthese mit FAD, FMN, Rb und ADP beschrieben werden soll. (Abb. 15)

Während bei der Standardresynthese mit FAD ohne Inhibitor die katalytische Aktivität relativ gleichmäßig zunimmt und innerhalb der gesamten Beobachtungszeit stets oberhalb aller übrigen Werte liegt, verzögert sich die Aktivitätszunahme bei Verwendung der Inhibitoren ganz beträchtlich. Verallgemeinernd kann man sagen, die Katalysewirkung des Resyntheseproduktes setzt erst 40 min nach Resynthesebeginn ein, das ist die doppelte Zeitspanne wie bei der Resynthese ohne Inhibitoren.

Anfänglich liegt die Aktivität des Resyntheseproduktes mit ADP unterhalb der anderen Vergleichswerte, bis sich nach rund 6 Stunden alle Inhibitor-Resyntheseprodukte in ihrer katalytischen Aktivität nahezu angeglichen haben. Von diesem Zeitpunkt an vermindert FMN den Aktivitätszuwachs am stärksten, während sich ADP und Rb in ihrer Hemmwirkung die Waage halten. Insbesondere die Inhibitorwirkung des ADP läßt im Laufe der Zeit nach, so daß sich nach 20 Stunden kaum noch ein Unterschied zum inhibitorfreien Resyntheseprodukt feststellen läßt. Eine Begünstigung der katalytischen Wirksamkeit durch Ado und Ade, wie sie früher erwähnt wurde [9], konnte durch genauere Messungen nicht bestätigt werden.

4.4. Resyntheseversuche auf Sephadex-Gel (Gelfiltration)

4.4.1. Vorbemerkung

Bereits im Abschnitt 2.2. wurde darauf hingewiesen, daß die Resynthese aus Apoprotein und FAD zum Holoenzym nicht in einem, sondern in mehreren Schritten abläuft, wobei einer der Schritte durch eine Änderung der Tertiärstruktur bedingt werden sollte. Ausgehend von GERSTNERS Beobachtung, daß das Holoenzym eine Sephadex-Säule wesentlich langsamer durchwandert als das Apoprotein [28], sollte sich die Wanderungsgeschwindigkeit des Resyntheseproduktes im Laufe der Resynthese von einer großen zu einer kleineren Beweglichkeit im Sephadex-Gel ändern.

4.4.2. Meßergebnisse

Als Standardprobe dient natives Holoenzym, welches für die Wanderung durch das Sephadex-Gel etwa acht Stunden benötigt. Zwei Stunden nach Auftragen des Holoenzymen erfolgt die Resynthese auf der Säule (siehe dazu Praktischer Teil, Kapitel 13).

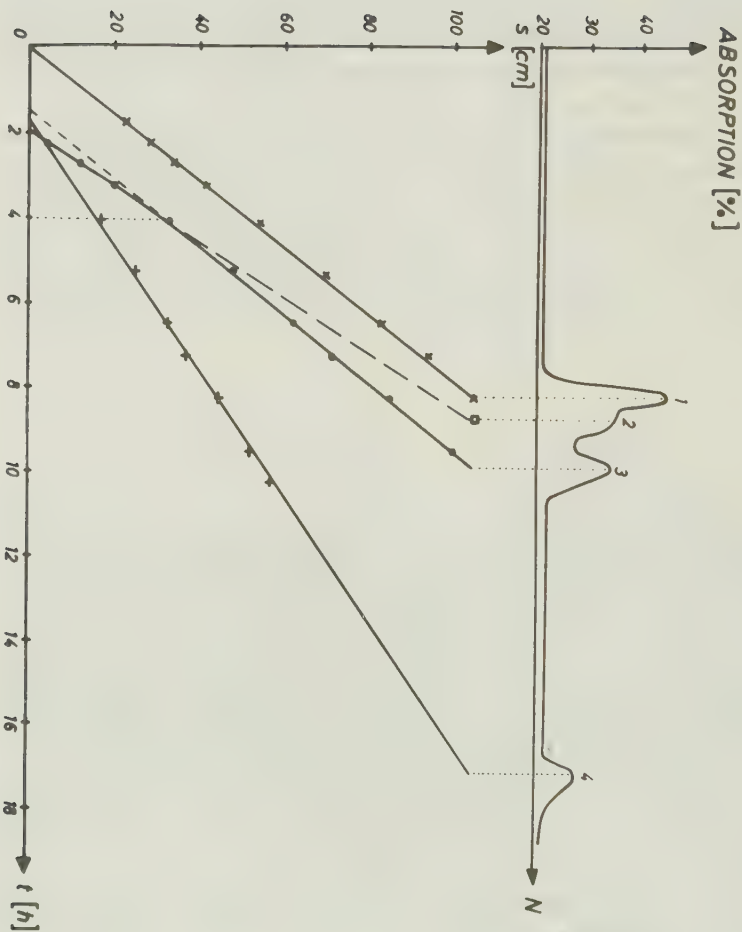


Abb. 16

Resynthese aus $1,43 \cdot 10^{-5}$ M APO und $1,5 \cdot 10^{-5}$ M FAD auf Sephadex G 100, x—x HOLO (1), ————□ APO (2), ————● Resyntheseprodukt (3), +——+ FAD (4), Elutionsmittel: 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 bei 14 °C

Nach einer halben Stunde läßt sich auf der Säule eine deutliche Auftrennung in zwei gelbe Ringe beobachten, die der Holoenzymprobe hinterherlaufen und von denen der langsamere die FAD-Fraktion ist. Auf der Säule kann der Lauf des Enzyms und des Resyntheseproduktes sowie des nicht gebundenen FAD an der gelben Farbe bequem verfolgt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Holoenzym beläuft sich auf $12,7 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$, die des Resyntheseproduktes auf $15,4 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ und die des FAD auf $6,8 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$.

Die Wanderungsgeschwindigkeit des Apoproteins beträgt $15,4 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$, also durchwandert das Resyntheseprodukt die Sephadex-Säule zunächst mit derselben Geschwindigkeit wie das Apoprotein. Nach einer zweistündigen Verweilzeit im Sephadex-Gel verringert sich die Beweglichkeit des Resyntheseproduktes auf $12,5 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ und behält diesen Wert bei, bis die Probe die Säule verläßt. Das Resyntheseprodukt nimmt also in dieser Zeit die Beweglichkeit des Holoenzym an.

Stellt man die zurückgelegte Strecke der vier Fraktionen als Funktion der Zeit in einem Diagramm dar, dann zeigt sich, daß sich die Kurve des Resyntheseproduktes aus zwei Geraden zusammensetzt, die sich an der Stelle 4 h (= 2 Stunden Verweildauer auf der Säule) schneiden. Die Gerade, die den Verlauf in den ersten beiden Stunden wiedergibt, verläuft auf der Wanderungsgeraden des Apoproteins, die andere verläuft parallel zur Wanderungsgeraden des Holoenzym.

Zwei Stunden nach Resynthesebeginn erfolgt also eine Änderung der Proteinkonformation in eine neue, die der des Holoenzym zumindest ähnlich ist.

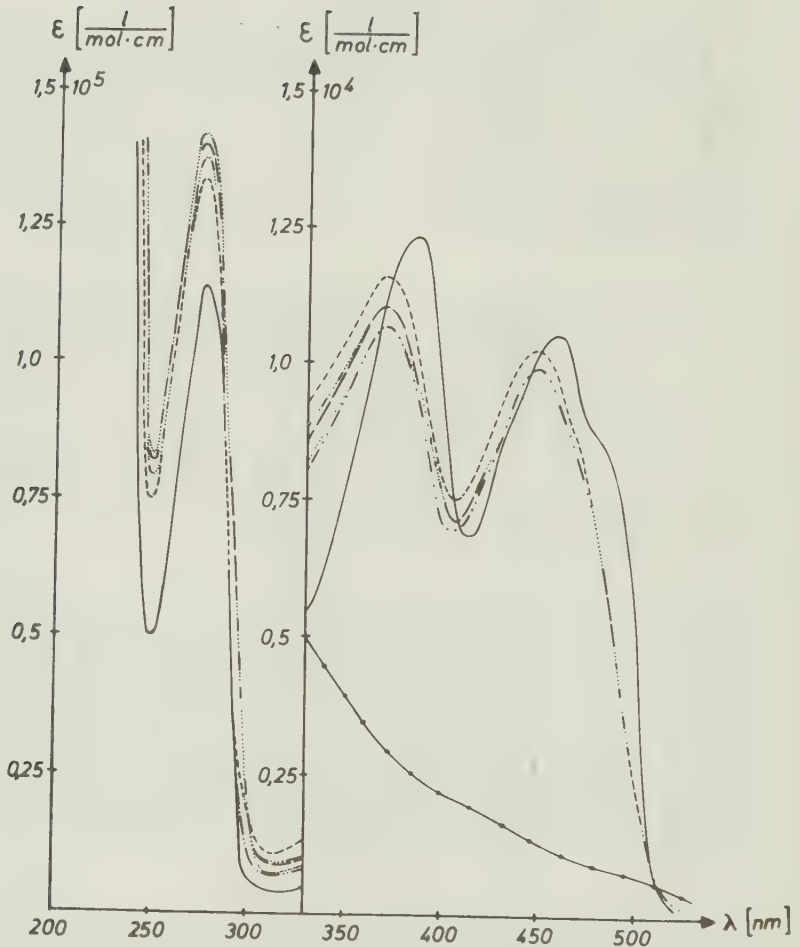


Abb. 17a

UV/Vis-Spektrum des Resyntheseproduktes 1 min,
..... 12 min, ——— 1 h, — · — 2 h und — — — 18 h
nach Resynthesebeginn sowie ····· APO und ——— Oxase
bei 20 °C in 0,1 M Pyrophospharpuffer pH 7,5

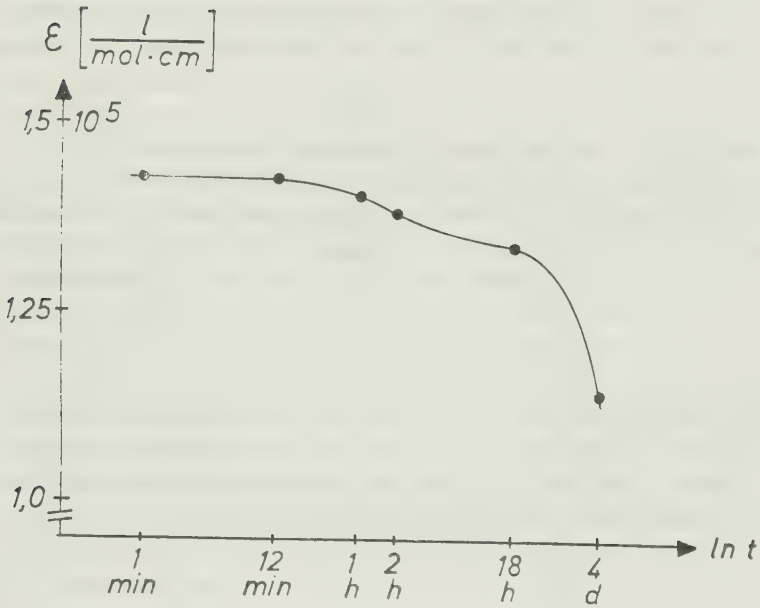


Abb. 17b

Resynthese unter den Bedingungen der Abb. 17a, Änderung der 275 nm-Bande während der Resynthese

4.5. Spektroskopische Untersuchungen zur Resynthese

4.5.1. UV/Vis-Spektren

Das charakteristische UV/Vis-Spektrum der Oxynitrilase setzt sich im wesentlichen aus den Proteinbanden bei etwa 220 nm und 275 nm (Tyrosin) und den längerwelligen FAD-Banden bei etwa 380 nm und 450 nm zusammen.

Unmittelbar nach dem Resynthesebeginn ändert sich das "gemeinsame" Spektrum von FAD und Apoprotein in Richtung auf das Oxynitrilase-Spektrum. Die Extinktion im UV-Bereich zwischen 240 nm und 300 nm sinkt rasch ab, während im sichtbaren Bereich die Banden bei 370 nm und 450 nm allmählich zunehmen. Nach 18 Stunden erscheint bei 472 nm die Schulter an der 450 nm-Bande.

Bemerkenswerterweise bleibt innerhalb der ersten 18 Stunden die Verschiebung der Banden bei 370 nm und 450 nm in den längerwelligen Bereich aus; erst das vollständig renaturierte Produkt weist das sogenannte hydrophobe Spektrum auf.

4.5.2. CD-Spektrum

Änderungen des CD-Spektrums, die Rückschlüsse auf den Resyntheseablauf zulassen, konnten nicht festgestellt werden.

4.5.3. Fluoreszenzspektrum

Das Fluoreszenzspektrum des Resyntheseproduktes bei pH 7,5 unterscheidet sich 20 Stunden nach Resynthesebeginn kaum von dem des nativen Enzyms. Das Spektrum des Resyntheseproduktes ist gekennzeichnet durch das Verhältnis der 464 nm-Bande zur 380 nm-Bande von 1,38:1. Dagegen verhalten sich dieselben

Banden des Holoenzym mit 1,36:1 nur unwesentlich anders. Im Gegensatz zu Abb. 18 liegt in Abb. 5 das Holoenzym in einer höheren Konzentration vor, und daher erscheinen wegen des gesteigerten Auflösungsvermögens lediglich noch einige zusätzliche Feinstrukturen im Bereich von 440 nm bis 464 nm.

Von weit größerem Interesse als das Erscheinungsbild des Fluoreszenzspektrum ist jedoch die Fluoreszenzausbeute während der Resynthese. KNAUF [29] konnte bereits auf den Fluoreszenzabfall des FAD bei Zugabe von Apoprotein hinweisen. In Gegenwart von Apoprotein nimmt die FAD-Fluoreszenz kontinuierlich ab, die Reaktion ist nach einer Stunde noch nicht abgeschlossen.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt auch SWOBODA bei der Resynthese der Glucose-Oxidase von *Aspergillus niger* [30]; dagegen berichten TSUGE und MITSUDA [31] bei der Resynthese einer anderen Glucose-Oxidase von einer anfänglichen Fluoreszenzsteigerung mit anschließendem Fluoreszenzabfall. Das FAD wird aber hier offenbar nach einem anderen Mechanismus in das Enzym eingebaut, zumal dieses im Gegensatz zu den anderen beiden Enzymen 2 mol FAD auf 1 mol Protein enthält.

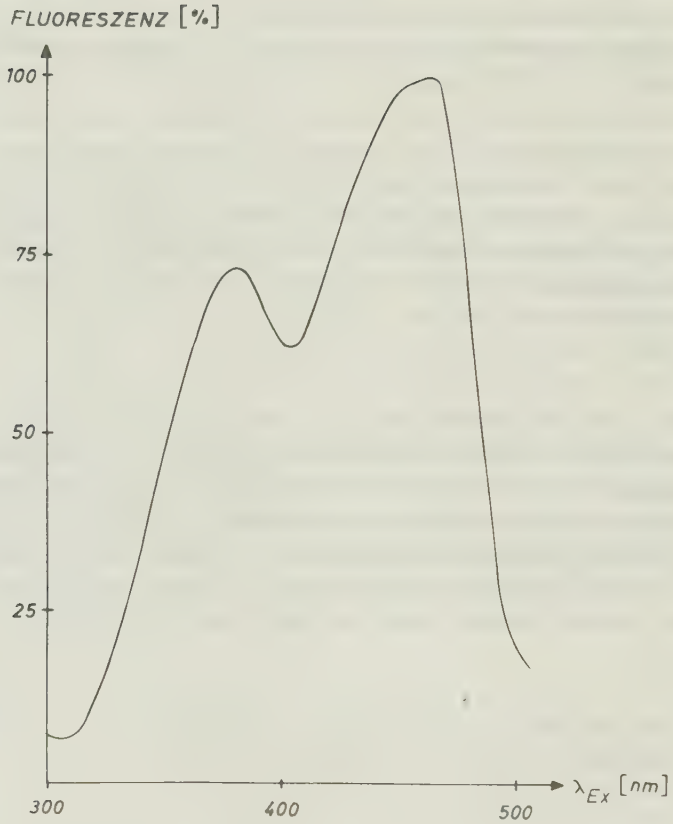


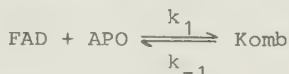
Abb. 18

Fluoreszenzspektrum des Resyntheseproduktes aus FAD und APO
20 h nach Resynthesebeginn, $\lambda_{Em} = 525 \text{ nm}$

5. Thermodynamische Größen

5.1. Thermodynamische Größen in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Bestimmung thermodynamischer Größen für die erste Teilreaktion der Resynthese



wird in dem Augenblick problematisch, wo der betrachtete pH-Bereich auch solche pH-Werte umfaßt, bei denen entweder nur die Spaltung oder nur die Resynthese untersucht wurde. Lediglich im Bereich von pH 3,9 bis pH 4,55 überlappen sich der untersuchte pH-Bereich für die Spaltung und der für die Resynthese. Um aber dennoch einen Überblick über den gesamten behandelten pH-Bereich zu gewinnen, wurde angenommen, daß sich die Reaktionsordnung, in der sich die H_3O^+ -Konzentration auf Spaltung und Resynthese auswirkt, bei der Spaltung oberhalb pH 4,55 und bei der Resynthese unterhalb pH 3,9 nicht ändert. Da bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten darauf verzichtet wurde, deren pH-Abhängigkeit stets mitanzugeben

(z.B. $k_1 = \bar{k}_1 \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]^{\frac{1}{2}}$), erscheint auch die Gleichgewichtskonstante K im betrachteten pH-Intervall als eine von der H_3O^+ -Konzentration abhängige Variable.

5.1.1. Gleichgewichtskonstante K

Die K -Werte für 20 °C werden gemäß der Beziehung $K = \frac{k_1}{k_{-1}}$ berechnet und stehen in der ersten Spalte der Tabelle 6. In Spalte 2 stehen die aus der Temperaturabhängigkeit auf 0 °C umgerechneten Werte für K , und in Spalte 3 sind die Prozentanteile x_a des vom FAD befreiten Proteins an der Gesamtproteinkonzentration e_0 aufgeführt, für den Fall, daß sich das

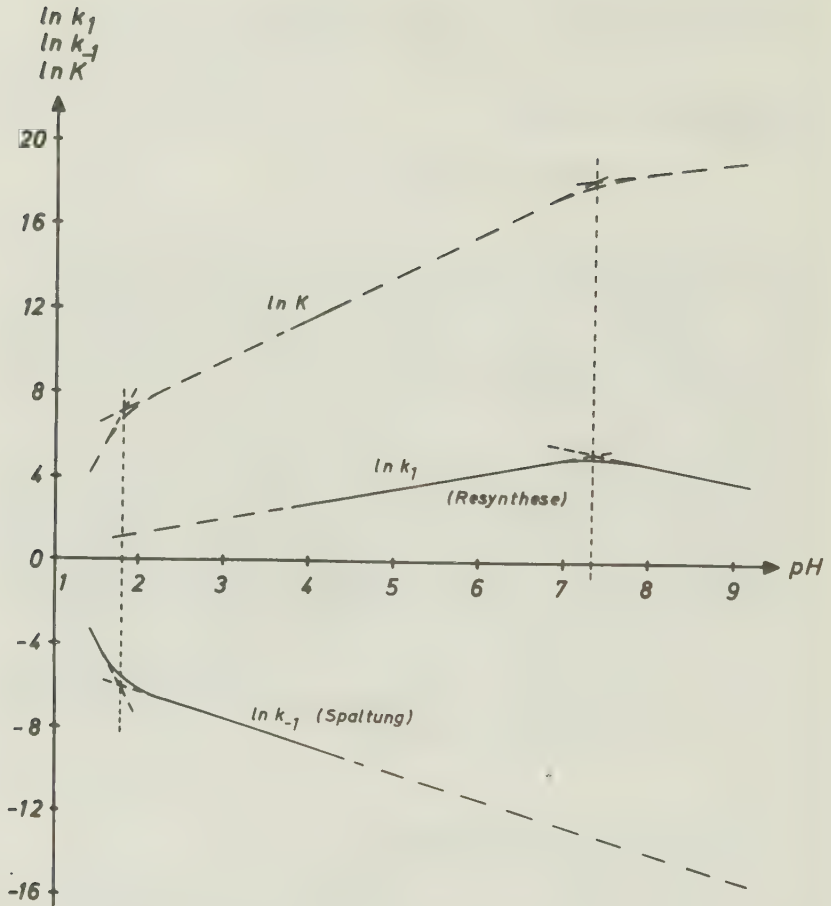


Abb. 19

Gleichgewichtskonstante K und Geschwindigkeitskonstanten k_1 (Resynthese) und k_{-1} (Spaltung) in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 20 °C

Spaltungsgleichgewicht bei 0 °C aus einer Holoenzymkonzentration von $e_o = 7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ eingestellt hat. Wird eine bestimmte Ausgangskonzentration an Oxynitrilase vorgegeben, dann lassen sich die Gleichgewichtskonzentrationen von Apoprotein und ungespaltener Oxynitrilase über die Gleichung

$$K = \frac{e_o - apo}{apo^2} \quad (20)$$

mit e_o = Ausgangskonzentration der Oxynitrilase

apo = Gleichgewichtskonzentration des Apoproteins

berechnen. In Spalte 4 werden dieselben Prozentanteile angegeben wie in Spalte 3, jedoch für eine Ausgangskonzentration an nativem Enzym von $e_o = 10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Man erkennt sofort, daß sich bei einer Erhöhung der Ausgangskonzentration an Oxynitrilase das Gleichgewicht zugunsten des Holoenzym verschiebt.

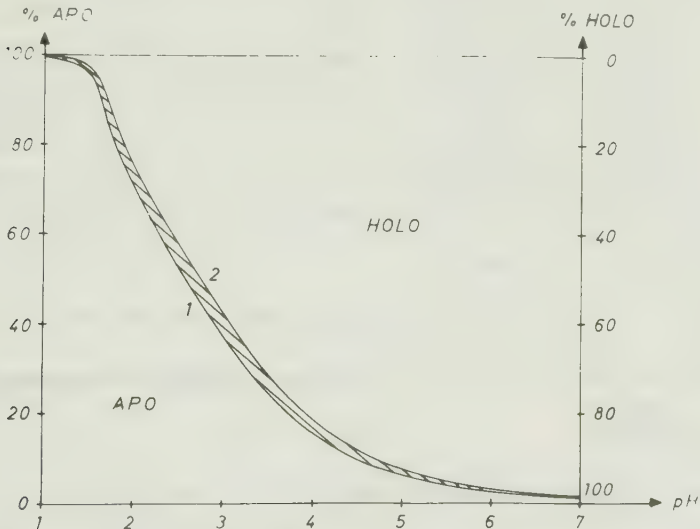


Abb. 20

Mischungsverhältnis HOLO/APO im Gleichgewicht bei 0 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert, Ausgangskonzentration des ungespaltenen Enzyms: $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (1) und $7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (2)

Tabelle 6

Gleichgewichtskonstanten K für 20 °C und 0 °C sowie Mischungsverhältnisse der Komponenten Holoenzym/Apoenzym im Gleichgewichtszustand in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH	K ¹⁾ für 20 °C ₁ in l·mol ⁻¹	K für 0 °C ₁ in l·mol ⁻¹	x _a ²⁾ für e _o = 7mg·ml ⁻¹ in %	x _a ²⁾ für e _o = 10mg·ml ⁻¹ in %
1,5	9,60 · 10 ¹	2,72 · 10 ²	97	96
1,7	5,03 · 10 ²	1,42 · 10 ³	89	85
1,9	1,30 · 10 ³	3,68 · 10 ³	78	72
2,1	1,96 · 10 ³	5,54 · 10 ³	72	66
2,5	4,32 · 10 ³	1,22 · 10 ⁴	58	52
3	1,17 · 10 ⁴	3,32 · 10 ⁴	42	37
3,5	3,19 · 10 ⁴	9,02 · 10 ⁴	28	24
4	8,67 · 10 ⁴	2,45 · 10 ⁵	18	16
4,5	2,36 · 10 ⁵	6,67 · 10 ⁵	12	10
5	6,41 · 10 ⁵	1,81 · 10 ⁶	7,2	6
6	4,69 · 10 ⁶	1,33 · 10 ⁷	2,7	2,3
7	3,43 · 10 ⁷	9,70 · 10 ⁷	1	0,8
7,3	5,27 · 10 ⁷	1,49 · 10 ⁸		
8	8,95 · 10 ⁷	2,53 · 10 ⁸		
9	1,35 · 10 ⁸	3,82 · 10 ⁸		

1) aus der Kurve der Abb. 19 graphisch interpolierte Werte

2) $x_a = \frac{apo}{e_o}$

Interessant ist ein Vergleich mit einigen Literaturwerten über Resynthesen anderer Flavoproteine. Im neutralen Bereich schwanken die Dissoziationskonstanten zwischen $K = 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [32], [33] und $K = 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [27], [34], und NYGAARD und THEORELL geben für das Alte Gelbe Ferment gar einen Wert von $K = 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ an [35], so daß man die Oxynitrilase hinsichtlich ihrer Dissoziationskonstante im unteren Bereich dieser Liste ansiedeln muß.

Geht man von dem günstigen Fall aus, daß die Ausbeute an Apoprotein bei der sauren Spaltung der Oxynitrilase nach 20 min Spaltungsdauer in der auf 0°C bis 1°C temperierten Lösung 90 % des theoretischen Wertes erreicht, und nimmt man ferner den pH-Wert der Spaltungslösung mit 2,3 an (sie wird mit 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 verdünnt), dann dürften bei einer Ausgangskonzentration an Oxynitrilase von $7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ etwa 58 % davon als Apoprotein vorliegen. Wiederholt man den Spaltungsvorgang noch zweimal, so enthält die Apoenzymlösung am Ende noch 7 % intaktes Enzym. Geht man dagegen von der höheren Konzentration von $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ aus, dann steigt die Verunreinigung der Apoenzymlösung durch natives Enzym auf etwa 10 %. Im Abschnitt 11.3.1. werden die technischen Grenzen der Spaltung und Reinigung näher beschrieben.

5.1.2. Freie molare Standardreaktionsenthalpie

Entsprechend der Gleichung

$$\Delta G^0 = - RT \ln K \quad (21)$$

verläuft die Kurve für $-\Delta G^0$ proportional zur Kurve für $\ln K$, beides in Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei pH = 1,78 und pH = 7,3 weisen beide Kurven dieselben Knicke auf, die schon bei der Besprechung der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} erwähnt wurden.

Tabelle 7

Gleichgewichtskonstante K für 25 °C für Spaltung und Resynthese der Oxynitrilase und freie molare Standardreaktionsenthalpie in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH	K ¹⁾ für 25 °C in l·mol ⁻¹	-ΔG° in J·mol ⁻¹
1,5	1,07·10 ²	1,16·10 ⁴
1,7	3,51·10 ²	1,45·10 ⁴
2	1,20·10 ³	1,76·10 ⁴
2,5	3,57·10 ³	2,03·10 ⁴
3	9,61·10 ³	2,27·10 ⁴
4	7,10·10 ⁴	2,77·10 ⁴
5	5,34·10 ⁵	3,27·10 ⁴
6	3,99·10 ⁶	3,77·10 ⁴
7	2,75·10 ⁷	4,24·10 ⁴
8	7,48·10 ⁷	4,49·10 ⁴
9	1,13·10 ⁸	4,59·10 ⁴

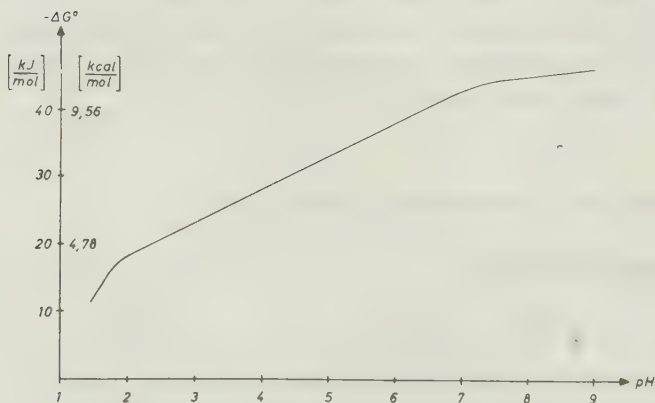


Abb. 21

Freie molare Standardreaktionsenthalpie bei 25 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert

1) berechnet nach $K = \frac{k_1}{k_{-1}}$ für $T = 298 \text{ K}$

5.2. Thermodynamische Größen bei pH 4

5.2.1. Aktivierungsenergie

Für die Resynthese des Holoenzymys bei pH 4 berechnet sich die Aktivierungsenergie $E_{a,1}$ gemäß der Beziehung

$$E_a = \frac{R \cdot T_1 \cdot T_2}{T_1 - T_2} \ln \frac{k_1}{k_2} \quad (22)$$

mit den nach Abb. 12 berechneten Größen

$$\begin{aligned} T_1 &= 283 \text{ K} \\ T_2 &= 303 \text{ K} \\ k_{1,1} &= 9,49 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \\ k_{2,1} &= 21,7 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \\ R &= 8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \end{aligned}$$

zu

$$E_{a,1} = 2,94 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

In diesem Falle stehen die Werte $k_{1,1}$ und $k_{2,1}$ für die Geschwindigkeitskonstante k_1 in Abhängigkeit von der Temperatur T_1 bzw. T_2 , also $k_{1,1} = k_1(T_1)$ und $k_{2,1} = k_1(T_2)$.

Unter Verwendung der Werte nach Abb. 8 läßt sich entsprechend für die Spaltung des Holoenzymys bei pH 4 die Aktivierungsenergie $E_{a,-1}$ aus den Größen

$$\begin{aligned} T_1 &= 283 \text{ K} \\ T_2 &= 323 \text{ K} \\ k_{1,-1} &= 6,71 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \\ k_{2,-1} &= 1,80 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

zu

$$E_{a,-1} = 6,25 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

bestimmen.

5.2.2. Molare Standardreaktionsenthalpie

Entsprechend der Gleichung

$$E_a = \Delta H^\ddagger + 2 RT \quad (23)$$

berechnet sich die Aktivierungsenthalpie $\Delta H^\ddagger_1$ für die bimolekular ablaufende Resynthese bei $T = 298 \text{ K}$ zu

$$\Delta H^\ddagger_1 = 2,45 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

und für die monomolekulare Spaltung ergibt sich über die Gleichung

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (24)$$

bei ebenfalls $T = 298 \text{ K}$ eine Aktivierungsenthalpie von

$$\Delta H^\ddagger_{-1} = 6,0 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

Als Differenz dieser Aktivierungsenthalpien läßt sich die molare Standardreaktionsenthalpie ΔH° von der Größe

$$\Delta H^\circ = -3,6 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \quad (= -8,5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$$

bestimmen [36].

5.2.3. Freie molare Standardreaktionsenthalpie

Aus den erhaltenen Meßkurven der Abb. 8 und der Abb. 12 ergeben sich für die Resynthese und Spaltung bei pH 4 und 25°C die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten

$$k_1 = 17,8 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$\text{und } k_{-1} = 2,51 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}.$$

Über die Beziehung

$$K^\ddagger = \frac{k \cdot h}{k_B \cdot T} \quad (25)$$

mit k = Geschwindigkeitskonstante
 $h = 6,625 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ (Plancksche Konstante)
 $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ (Boltzmann-Konstante)
 $T = 298 \text{ K}$ (Standardbedingung)

findet man die beiden Gleichgewichtskonstanten K_1^* und K_{-1}^* .
 K_1^* ist die Gleichgewichtskonstante zwischen den Edukten FAD und APO und dem aktivierten Komplex X^* bei der Resynthese, und K_{-1}^* ist die Gleichgewichtskonstante zwischen dem Holoenzym (bzw. Komb) und dem aktivierten Komplex X^* bei der Spaltung [37], [38]. Aus den zugrundegelegten Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} lassen sich die Größen

$$K_1^* = 2,87 \cdot 10^{-12} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\text{und } K_{-1}^* = 4,04 \cdot 10^{-17}$$

berechnen. Die Gleichung

$$\Delta G^* = - RT \ln K^* \quad (26)$$

erlaubt es, für die Spaltung und Resynthese die entsprechenden freien molaren Aktivierungsenthalpien zu bestimmen. Aus den angeführten Werten erhält man für die Resynthese die freie molare Aktivierungsenthalpie

$$\Delta G_1^* = 6,6 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

und für die Spaltung

$$\Delta G_{-1}^* = 9,4 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

Danach beträgt die freie molare Standardreaktionsenthalpie für die Reaktion



$$\Delta G^0 = -2,8 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \quad (= -6,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}).$$

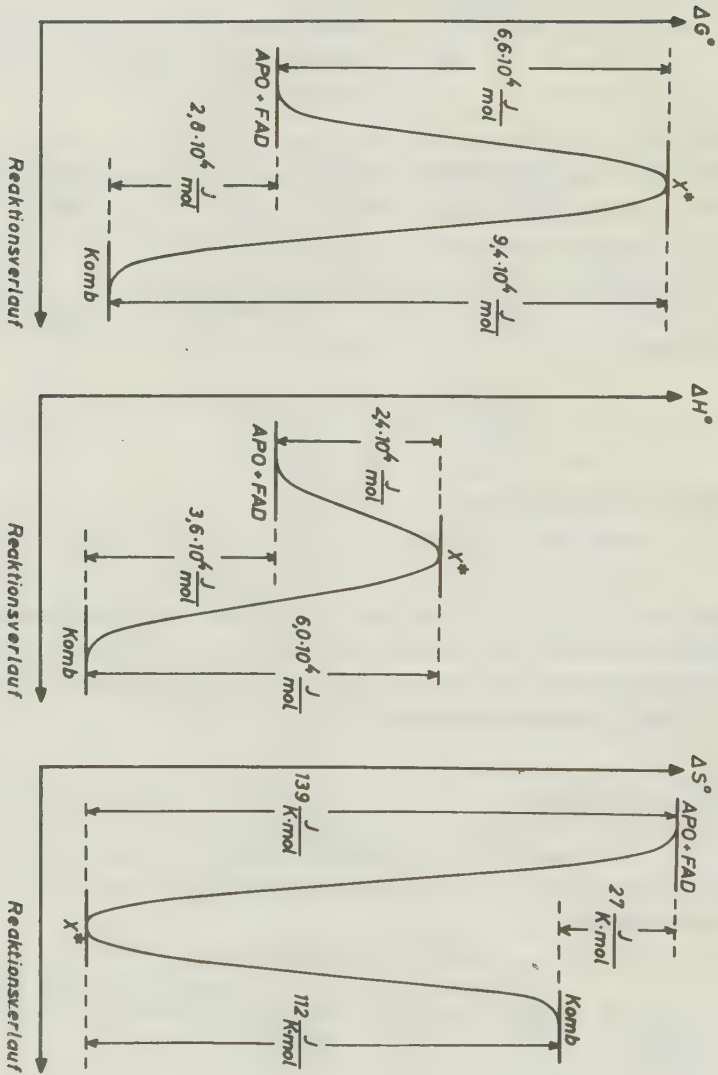


Abb. 22

Thermodynamische Größen der Reaktion $\text{FAD} + \text{APO} \rightleftharpoons \text{Komb}$ bei pH 4 und 25°C

5.2.4. Molare Standardreaktionsentropie

Aus $\Delta H^\ddagger$ und $\Delta G^\ddagger$ berechnet man die Aktivierungsentropie $\Delta S^\ddagger$ gemäß

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T} \quad (27)$$

und erhält für $T = 298 \text{ K}$

$$\Delta S^\ddagger_1 = -139 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

als Resynthese-Aktivierungsentropie und

$$\Delta S^\ddagger_{-1} = -112 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

als Aktivierungsentropie für die Spaltung. Daraus läßt sich die Standardreaktionsentropie ΔS° bestimmen, die mit

$$\Delta S^\circ = -27 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \quad (= -6,3 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$$

dem Betrage nach verhältnismäßig klein ausfällt.

Gemessen an der Größe der beteiligten Moleküle erreicht die Reaktionsentropie nur geringe Werte. Allerdings ist auch der Unterschied zwischen der Sandwichform des FAD und der gebundenen Form des FAD im Zustand Komb bemerkenswert klein. Ausgehend von der Sandwichform nimmt die Ordnung beim Übergang in die offene Form merklich ab, und sie nimmt bei der Ausbildung des Zustandes Komb wieder zu. Entsprechend groß fallen die Aktivierungsentropien aus. Der Beitrag des Proteins an der Reaktionsentropie dürfte für die erste Teilreaktion zur Bildung des Reaktionsproduktes Komb nicht sonderlich groß sein, denn die bedeutsamen Konformationsänderungen setzen erst später im weiteren Verlauf der Resynthese ein (vergl. Abschnitt 7.4.).

6. Molekülmassenbestimmung

Obwohl das Enzym Oxynitrilase bereits mit einer Molekülmasse von 75 000 u [4] bzw. 70 000 u [8] beschrieben wurde, lassen doch zwei Gründe eine Wiederholung dieser Molekülmassenbestimmung sinnvoll erscheinen.

6.1. Gelfiltrationsmethode

Die Oxynitrilase wurde bei der Molekülmassenbestimmung nach der Gelfiltrationsmethode als Gemisch der drei Isoenzyme eingesetzt. Nun liegen aber die drei Isoenzyme nicht als drei voneinander völlig unabhängige Teile vor, sondern sie stellen ein - wenn auch nur locker assoziiertes - Aggregat dar, bei dem sich die drei Isoenzyme gegenseitig beeinflussen. (Siehe dazu Abschnitt 4.3.2.; die katalytische Aktivität des nativen Enzyms liegt höher als die jedes einzelnen Isoenzym.)

Ferner wies GERSTNER [28] auf den bemerkenswerten Umstand hin, daß die Oxynitrilase bei der Bestimmung der Molmasse nach der Gelfiltrationsmethode in der Holo-Form einen etwa um 20 % niedrigeren Wert liefert als das native Apoprotein. Bei Gegenwart von FAD wird eine kugelförmige Konformation vermutet, beim Apoenzym dagegen eine ellipsoide. Die Holo-Form täuscht wegen der langsameren Wanderung auf einer Sephadex-Säule eine zu geringe Molekülmasse vor.

Es sollte nun festgestellt werden, ob und in welchem Ausmaß die Molekülmasse des Holoenzym sich als arithmetisches Mittel der Molekülmassen der Isoenzyme erweist. Die Auftrennung der Oxynitrilase in ihre drei Isoenzyme erfolgte über Gradientenelution am DEAE-Ionenaustauscher, und von jedem dieser Isoenzyme wurde einzeln mittels der Gelfiltrationsmethode nach WIELAD, DUESBERG und PETERMANN [39] die Molekülmasse bestimmt.

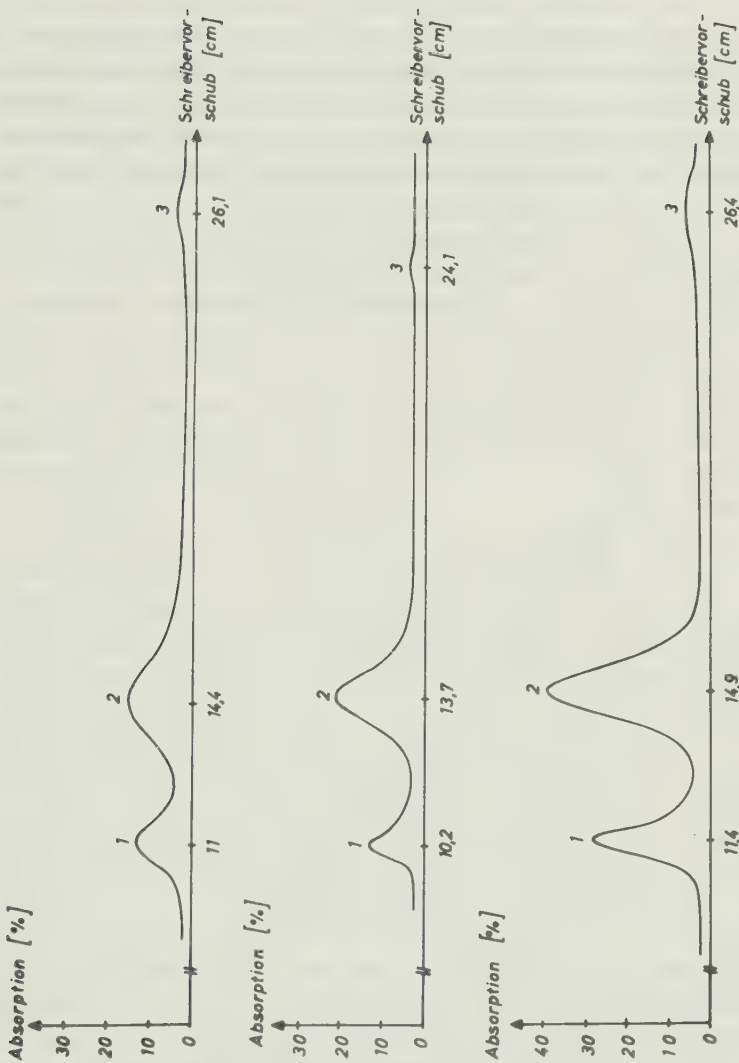


Abb. 23

Elutionsprofile zur Molekülmassenbestimmung von Iso 1 (1. Kurve), Iso 2 (2. Kurve), und Iso 3 (3. Kurve) auf Sephadex G 100; (1) Hühnerealbumin, (2) Rinderalbumin und Isoenzyme, (3) Ferritin, Elutionspuffer: 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 bei 14 °C

Alle drei Isoenzyme wurden jeweils zusammen mit der Eichsub-
stanz Rinderalbumin (MM = 67 000 u) im Eluat aufgegangen. Die
Molekülmasse der Oxynitrilase ergibt sich daher ebenfalls mit
MM = 67 000 u und liegt sehr nahe bei dem zuvor bestimmten
Wert von 70 000 u. Die nach dem Elutionsprofil ermittelten
Anteile der Isoenzyme am Holoenzymgemisch belaufen sich auf

Iso 1 9,3 %

Iso 2 53,7 %

Iso 3 37,0 %

und entsprechen den von ASCHHOFF [40] gefundenen Werten.

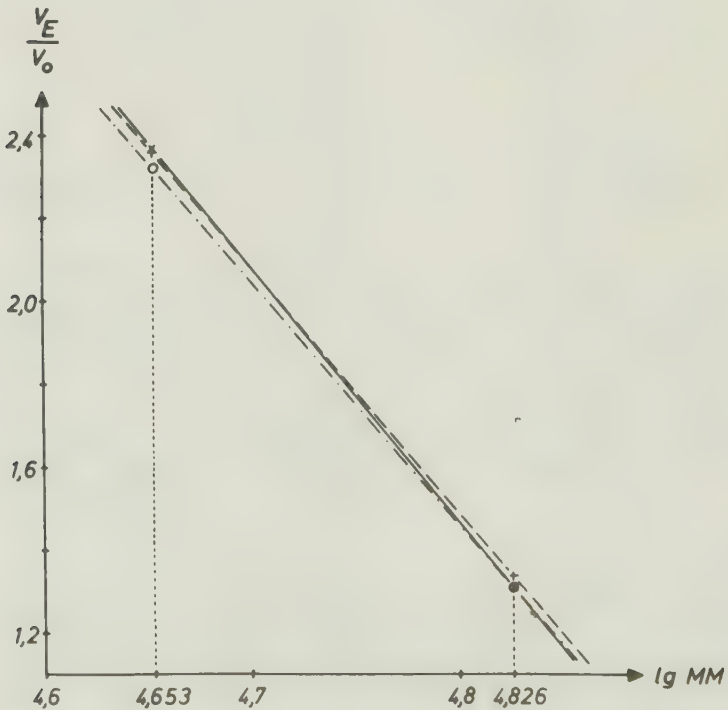


Abb. 24

Eichkurven zur Molekülmassenbestimmung mit Iso 1 x—x, Iso 2 +---+ und Iso 3 o---o

6.2. Kinetische Methode

BECKER bestimmte die Molekülmasse der Oxynitrilase mit 70 000 u [3]. Er berechnete diesen Wert unter der Annahme, daß auf 1 mol Protein auch 1 mol FAD entfällt. Diese Annahme ist zwar plausibel, doch berichten einige Autoren, wie z.B. MASSEY, PALMER und BENNET [41] vom Enzym D-Aminosäure-Oxidase oder OTAIZA und JAENICKE [32] von der NADH-FAD-Oxidoreduktase aus E. coli oder auch weitere Autoren [42], [43] von einem anderen Mengenverhältnis. Hierbei handelt es sich durchweg um Enzyme mit 2 mol FAD auf 1 mol Protein.

Da es sich bei der Oxynitrilase um ein Gemisch von Isoenzymen handelt, von denen keines frei von FAD ist, muß das Mengenverhältnis

$$\frac{[\text{FAD}]}{[\text{Protein}]} \geq 1$$

sein. Die entsprechende Reaktionsgleichung müßte für die Spaltung

$$\text{Oxase} \longrightarrow \text{APO} + q \text{ FAD} \quad \text{mit } q \geq 1$$

lauten, wobei für q auch gebrochene Zahlen zugelassen sind. Die saure Spaltung gehorcht einer Reaktionsgleichung erster Ordnung, und das Apoprotein zerfällt bei schonender Behandlung nicht. Somit gilt das Zeitgesetz

$$\frac{1}{q} \cdot f = h_0 \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (28)$$

mit

$$\begin{aligned} h_0 &= [\text{Oxase}] \quad \text{zur Zeit } 0 \\ f &= [\text{FAD}] \quad \text{zur Zeit } t \\ k &= \text{Geschwindigkeitskonstante.} \end{aligned}$$

Durch Vergleich der experimentell ermittelten Kurven mit Kurven der Gleichung (28) für $q = 0,8 + \frac{n}{10}$, wobei n die Zahlen 0, 1, 2, 3, 12 durchläuft, ergab sich bei jeweils unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten k die beste Übereinstimmung beider Kurven stets für $n = 2$, d.h. $q = 1$. Demnach beläuft sich der FAD-Gehalt der Oxynitrilase auf 1 mol FAD pro mol Protein.

7. Diskussion

7.1. Folgerungen aus den Inhibitorversuchen

7.1.1. Bindungsart des FAD

Seit der saueren Spaltung der Oxynitrilase in Apoprotein und ihre prosthetische Gruppe durch BECKER wurde zwar vermutet, daß das FAD nicht kovalent an das Protein gebunden sei, doch eine gezielte Überprüfung dieser Frage wurde bisher nicht vorgenommen.

In der Regel weisen die Flavoproteine keine kovalenten Bindungen zu ihren prosthetischen Gruppen auf, und nur wenige Ausnahmen dieser Regel sind bekannt. Am besten untersucht ist wohl die Succinat-Dehydrogenase, der man schon seit längerer Zeit eine kovalente Bindung über die $8\alpha\text{-CH}_3$ -Gruppe des Isaloxazinteils an Histidin zuschreibt [44], [45]. Neuere Untersuchungen weisen diese Bindung als $8\alpha\text{-[N(3)-histidyl]}$ -Bindung aus [7].

Kovalent gebundenes Rb konnte bislang nicht durch konventionelle Methoden wie z.B. durch Denaturierung, sondern lediglich durch enzymatische Proteolyse freigesetzt werden. Das Flavin hängt so fest am Protein, daß das Protein erst in kleinere Peptide aufspaltet, bevor Rb freigesetzt wird [46]. Dagegen läßt sich die Oxynitrilase durch pH-Erniedrigung relativ leicht in FAD und Apoprotein spalten, und wenn bei der pH-Erniedrigung pH 4 nicht unterschritten wird, ist die Spaltung sogar reversibel.

Die verhältnismäßig starke Aktivitätseinbuße, die das Enzym bei der Inkubation mit FMN und Rb erleidet, weist auf eine lockere Bindung zwischen FAD und dem Protein hin. Die Verminderung der Aktivität kann nur durch eine Verdrängung des FAD durch einen der Inhibitoren gedeutet werden, denn eine eventuelle hydrophobe Wechselwirkung zwischen FAD und überschüssigem Inhibitor kommt als Ursache für die Aktivitätsminderung

deshalb nicht in Betracht, weil sonst auch FAD im Überschuß ähnlich aktivitätshemmend wirken müßte wie FMN oder Rb.

Die Reaktionsenthalpie von $\Delta H^0 = -3,6 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ reicht für die Spaltung einer kovalenten Bindung nicht aus. Die Dissoziationswärme ist noch geringer als bei der Spaltung des leicht zersetzlichen N_2O_3 [47], und zudem müßte ein Teil der Dissoziationswärme auch noch für die Trennung mehrerer anderer Bindungen aufgebracht werden. Dabei kann die Reaktionsenthalpie ΔH^0 als Richtwert für die Bindungsenergie angesehen werden [48].

Eine kovalente Bindung zwischen FAD und dem Protein muß also ausgeschlossen werden.

7.1.2. Bindungsstellen des FAD

Über die Lokalisierung der Bindungsstellen des Flavins gehen die Ergebnisse bei den verschiedenen Flavoproteinen auseinander. KUHN und RUDY bestimmen als Haftstellen des FMN für das Alte Gelbe Ferment die Diphosphatgruppe und eine Wasserstoffbrücke am Stickstoffatom in 3-Stellung des Isalloxazinteiles [49], und zum gleichen Ergebnis gelangen AKESON, EHRENBURG und THEORELL [50]. HEMMERICH, VEEGER und WOOD [20] übernehmen diese Deutung und weiten sie auf die meisten Flavinproteine aus. Bezüglich der Oxynitrilase teilen BECKER und PFEIL diese Meinung nicht [4]. Mit Sicherheit darf bei der Oxynitrilase von anderen Bindungsverhältnissen als bei den oben erwähnten Enzymen ausgegangen werden, denn im Gegensatz zu den meisten Flavoproteinen ist die Oxynitrilase eben kein Redoxkatalysator. Aus der Redoxblockierung der N-Atome in 1- und in 5-Stellung kann eine Wasserstoffbrücke über diese Atome erwartet werden, oder die Ausbildung einer hydrophoben Bindung zwischen Protein und den heteroaromatischen Ringen verhindert die für die Redoxreaktion typische Hydrierung in 1- und in 5-Stellung.

Wenn das Apoprotein bei der Resynthese eine völlig andere Tertiärstruktur aufweist als im nativen Zustand, kann sich das FAD zunächst nur über die Diphosphatgruppe an das Apoprotein anlagern. In diesem Zustand ist das ADP hinsichtlich der Konkurrenz um die Bindungsstelle am Protein dem FAD ebenbürtig. Aus diesem Grunde weist das ADP in den ersten 20 Stunden von allen eingesetzten Inhibitoren die größte kompetitive Hemmung auf. FAD und ADP stehen mit dem Protein im Gleichgewicht, wobei das FAD mit fortschreitender Umlagerung des Proteins über zusätzliche Bindungsmöglichkeiten eine ständig zunehmende Affinität zum Protein ausbildet und dadurch das ADP immer mehr und schließlich ganz aus dem Gleichgewicht verdrängt. Der "Vorsprung", den das ADP gegenüber FMN und Rb zu Beginn der Resynthese besitzt, verliert im Laufe der Resynthese immer mehr an Bedeutung, denn nach etwa 20 Stunden liegt die Hemmwirkung des ADP unter der des FMN und Rb.

Hierdurch erklärt sich, weshalb ADP zwar bei der Resynthese, nicht aber bei der Inkubation mit intaktem Enzym eine kompetitive Hemmung aufweist. Die Diphosphatgruppe hat die größte Bedeutung offenbar bei der spontanen Anlagerung des FAD bei der Resynthese sowie für die Stabilisierung des Apoproteins, denn im Gegensatz zum Pyrophosphatpuffer neigt das in Sörensenpuffer gelöste Apoprotein zu verstärkter Denaturierung.

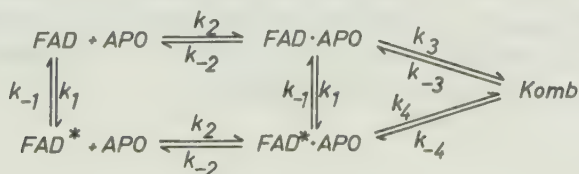
Die Affinität des FMN zum Protein ist wesentlich schwächer als die des FAD, denn sowohl bei der Resynthese als auch bei der Inkubation kann FMN die Aktivität des Enzyms nur auf etwa 75 % der Normalaktivität vermindern. Dagegen müßte bei gleicher Affinität das Resyntheseprodukt wegen des Überschusses an FMN rund 17 % der Normalaktivität aufweisen. Offenbar ist das FAD bei dieser kompetitiven Reaktion dem FMN wegen der Diphosphatgruppe und des Adeninteiles in der Besetzung der Bindungsstellen am Protein überlegen. Dementsprechend fällt die Hemmung durch Rb noch geringer als bei FMN aus.

Ferner ist das FAD sowohl über Wasserstoffbrücken, welche auf dem Isalloxazinteil ebenso vorkommen wie auf dem Adenosinteil, als auch hydrophob gebunden. Wasserstoffbrücken sind vor allem an den Hydroxygruppen und an den Stickstoffatomen des Adenins zu erwarten. Ebenso sind der Isalloxazinteil und der Adeninrest gleichermaßen zu einer hydrophoben Bindung zu Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan oder Histidin befähigt.

7.2. Addition des FAD an das Protein

Dem Einbau des FAD in das Protein der Oxynitrilase liegt ein anderer Mechanismus zugrunde als der von TSUGE und MITSUDA [31] beschriebene. Eine anfängliche Fluoreszenzzunahme konnte bei der Resynthese der Oxynitrilase nicht beobachtet werden. Bei der Resynthese der Oxynitrilase tritt eine spontane Addition des FAD an das Apoprotein ein, für die die Diphosphatgruppe nicht allein verantwortlich sein kann. Die Anlagerung des FAD ist begleitet von einer Fluoreszenzlösung, und zwar unabhängig vom pH-Wert, das heißt, es ist gleichgültig, ob das FAD in Sandwichform oder in offener Form vorliegt. Man beachte, daß bei pH 6 noch eine Restfluoreszenz von rund 18 % gegenüber der bei pH 2,61 auftritt. Beide Formen dieses Gleichgewichtes - die offene Form und die Sandwichform - sind befähigt, sich zusätzlich über den Isalloxazinteil an das Apoprotein anzulagern. Die fluoreszierende offene Form des FAD wird dem Gleichgewicht entzogen, und infolgedessen nimmt die Fluoreszenz ab.

Zur Veranschaulichung des Anlagerungsprozesses diene das folgende Modell



unter Verwendung der Größen

f = [FAD] in Sandwichform, nicht fluoreszierend

f^* = [FAD*] in offener Form, fluoreszierend

fa = [FAD·APO], Addukt aus Apo und FAD in Sandwichform, nicht fluoreszierend

fa^* = [FAD*·APO] Addukt aus Apo und FAD in offener Form, fluoreszierend

a = [APO]

komb = [Komb]

- 1) Das Gleichgewicht zwischen offener Form und Sandwichform ist bei freiem und bei über die Pyrophosphatgruppe fixiertem FAD gleichförmig.



Im Gleichgewichtszustand gilt

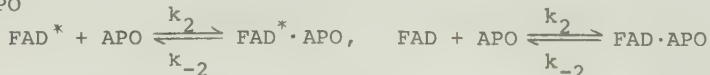
$$-\frac{df^*}{dt} = k_{-1}f^* - k_1f = 0 \quad (29a)$$

bzw.
$$-\frac{dfa^*}{dt} = k_{-1}fa^* - k_1fa = 0 \quad (29b)$$

Daraus folgt bei gleicher Lage des Gleichgewichtes

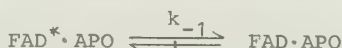
$$\frac{f^*}{f} = \frac{fa^*}{fa} = \frac{k_1}{k_{-1}} = K \quad (30)$$

- 2) Sowohl FAD^* als auch FAD reagieren im selben Ausmaß mit APO



Bei der offenen Form des FAD liegt die Fluoreszenz auch nach der Addition an das Apoprotein vor, und bei der Sandwichform ist für die Anlagerung über die Pyrophosphatgruppe keine Öffnung des Sandwichkomplexes nötig. Das Gleichgewicht zwischen FAD^* und FAD wird ebenso wie zwischen $\text{FAD}^* \cdot \text{APO}$ und $\text{FAD} \cdot \text{APO}$ aufrechterhalten.

- 3) Reagiert $\text{FAD}^* \cdot \text{APO}$ über den Isalloxazinteil mit dem Apoprotein, dann tritt Fluoreszenzlöschung ein, und bei der Reaktion des Isalloxazinteiles des nicht fluoreszierenden $\text{FAD} \cdot \text{APO}$ mit APO wird das Gleichgewicht ebenfalls zum nicht fluoreszierenden Partner verschoben, denn wegen der Reaktion des Isalloxazinteiles mit dem Apoprotein unterbleibt die Rückbildung der fluoreszierenden Komponente.



In beiden Fällen liegt als Reaktionsprodukt das unter (1) beschriebene Komb vor.

$$\frac{d \text{ komb}}{dt} = k_3 \cdot f_a + k_4 \cdot f_a^* - (k_{-3} + k_{-4}) \cdot \text{ komb} \quad (31)$$

Nun gilt aber

$$\frac{f_a^*}{f^* \cdot a} = \frac{k_2}{k_{-2}} \quad \text{und} \quad \frac{f_a}{f \cdot a} = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

woraus folgt

$$f_a^* = \frac{k_2}{k_{-2}} f^* \cdot a \quad \text{und} \quad f_a = \frac{k_2}{k_{-2}} f \cdot a$$

Daraus ergibt sich

$$\frac{d \text{ komb}}{dt} = (k_3 \cdot f + k_4 \cdot f^*) \frac{k_2}{k_{-2}} a - (k_{-3} + k_{-4}) \cdot \text{ komb} \quad (32)$$

Wegen $f_0 = f^* + f$ (f_0 ist die Ausgangskonzentration an FAD)

und
$$\frac{f^*}{f} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

kann
$$f^* = \frac{f_0 \cdot k_1}{k_{-1} + k_1} \quad \text{und} \quad f = \frac{f_0 \cdot k_{-1}}{k_{-1} + k_1}$$

gesetzt werden. Daraus folgt mit

$$\frac{d \text{ komb}}{dt} = \left(\frac{k_3 \cdot k_{-1}}{k_{-1} + k_1} + \frac{k_4 \cdot k_1}{k_{-1} + k_1} \right) \frac{k_2}{k_{-2}} a \cdot f_0 - (k_{-3} + k_{-4}) \cdot \text{ komb}$$

eine Geschwindigkeitsgleichung, die außer von den Konstanten nur von f_o , a und k_{omb} abhängt. Faßt man die Terme aus den Geschwindigkeitskonstanten zu neuen Konstanten gemäß

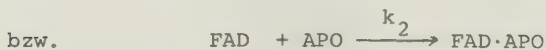
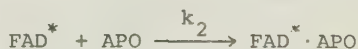
$$k_5 = \left(\frac{k_3 \cdot k_{-1}}{k_{-1} + k_1} + \frac{k_4 \cdot k_1}{k_{-1} + k_1} \right) \frac{k_2}{k_{-2}} \quad \text{und} \quad k_{-5} = k_{-3} + k_{-4}$$

zusammen, dann erhält man die vereinfachte Beziehung

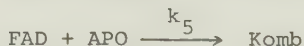
$$\frac{d \text{ komb}}{dt} = k_5 \cdot f_o \cdot a - k_{-5} \text{ komb} \quad (33)$$

wobei die Konstanten k_5 und k_{-5} für die Konstanten k_1 und k_{-1} der Gleichung (1) gesetzt werden.

Da die Reaktion $\text{FAD} + \text{APO} \longrightarrow \text{Komb}$ insgesamt als Reaktion zweiter Ordnung abläuft, muß die Zusammenlagerung



als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion



angesehen werden, zumal nach KOZIOL [19] $k_2, k_{-2} \ll k_1, k_{-1}$ gelten muß.

7.3. pH-Einfluß auf Spaltung und Resynthese

Die Hydroniumionen fördern oder hemmen die Spaltung und die Resynthese in recht unterschiedlichem Ausmaß, so daß es nahe-
liegt, die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten vom
pH-Wert als Titrationsvorgänge zu deuten.

Rechnet man bei der Spaltung (Abb. 7b) die Logarithmen der
Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} in die entsprechenden Numeri
um, so ergibt sich daraus die Abhängigkeit der Geschwindigkeits-
konstanten k_{-1} vom pH-Wert. Die daraus resultierende Kurve
entspricht dann einer Titrationskurve, wenn man annimmt, daß
die Geschwindigkeitskonstante k_{-1} bei gegebenem pH der Konzen-
tration einer bestimmten protonierten Base proportional ist.
Der quantitative Anteil der protonierten Base am Titrations-
gleichgewicht läßt sich als Molenbruch gemäß der Gleichung

$$x_S = \frac{1}{1 + K_S \cdot 10^{pH}} \quad (34)$$

bestimmen, und bei gegebenem K_S -Wert läßt sich eine Titra-
tionskurve in Abhängigkeit vom pH-Wert berechnen. Für ver-
schiedene K_S -Werte ergeben sich jeweils unterschiedliche Ti-
trationskurven. Die beste Übereinstimmung einer solchen Titra-
tionskurve mit der auf Numeri abgeänderten Experimentalkurve
der Abb. 7b ergibt sich für $pK_{S,1} = 1,55$.

Nach demselben Verfahren lassen sich aus der Kurve der Abb.
11b für die Resynthese die pK_S -Werte $pK_{S,2} = 6,1$ und $pK_{S,3}$
 $= 8,4$ ermitteln. Dabei wird $pK_{S,2}$ über den Vergleich des
rechten Teils der auf die Numeri abgeänderten Experimental-
kurve mit der Funktionskurve der Gleichung

$$x_B = \frac{K_S \cdot 10^{pH}}{1 + K_S \cdot 10^{pH}} \quad (35)$$

bestimmt. x_B ist der Molenbruch der nicht protonierten Base.

Ein unmittelbarer Vergleich der experimentell an der Oxynitrilase gefundenen pK_S -Werte mit Literaturwerten ist nicht möglich, denn wegen der hydrophoben Umgebung des aktiven Zentrums verschieben sich die pK_S -Werte nicht unerheblich gegenüber den in wäßriger Lösung ermittelten Literaturwerten. Dennoch ist mit $pK_{S,1} = 1,55$ die Nähe des Umschlagspunktes der ersten Titrationskurve zum zweiten pK_S -Wert des Diphosphats bei 1,49 [51] auffallend, und daher darf dieser experimentelle Befund wohl als die Protonierung der Diphosphatgruppe gedeutet werden. Bei fallendem pH wird die ionische Bindung zum FAD schließlich ganz aufgebrochen, und das Enzym kann dann nicht mehr in seiner nativen Konformation stabilisiert werden und denaturiert. Die Spaltung des Enzyms wird also wegen der Lockerung der ionischen Diphosphatbindung wesentlich beschleunigt.

Mit $pK_{S,2} = 6,1$ liegt der aus der Resynthesekurve gewonnene Wendepunkt der zweiten Titrationskurve relativ nahe bei $pK_S = 6,0$, dem pK_S -Wert der Histidin-Seitengruppe [52]. Unter dem erwähnten Vorbehalt darf daher eine hydrophobe Bindung des FAD an Histidin angenommen werden. Wegen der Störung des aromatischen Systems durch die Protonierung wird die hydrophobe Bindung geschwächt, doch macht ein Vergleich der Kurvensteigungen in Abb. 11b und Abb. 7b deutlich, daß die Protonierung des Histidin-Ringes die Oxynitrilase weit weniger schädigt als die Protonierung der Diphosphatgruppe.

Der Umschlagspunkt der dritten Titrationskurve bei $pK_{S,3} = 8,4$ weist auf ein weiteres, nicht näher identifiziertes Zentrum hin, bei dem aber die Protonierung die Spaltung hemmt und die Resynthese fördert.

Obwohl $pK_{S,1}$ aus der Spaltungskurve und $pK_{S,2}$ und $pK_{S,3}$ aus der Resynthesekurve ermittelt wurden, haben doch alle drei pK_S -Werte ihre Bedeutung sowohl für die Spaltung als auch

für die Resynthese, denn die Beschränkung der pH-Bereiche für die Spaltung und für die Resynthese erfolgte allein aufgrund von Überlegungen zur praktischen Durchführung der Versuche.

7.4. Konformationsänderungen

Das Protein weist im Zustand Komb keinerlei Anzeichen einer größeren Ordnung auf. Die Konformation ist der nativen Tertiärstruktur noch so unähnlich, daß das Resyntheseprodukt keine katalytische Wirksamkeit entfalten kann. Erst nach 20 Minuten hat sich das Protein zumindest im Bereich des aktiven Zentrums so weit umgelagert, daß das Resyntheseprodukt schwach aktiv wird. Innerhalb der ersten Stunde nach der Resynthese nimmt die Aktivität rasch zu, und es darf angenommen werden, daß dieser Aktivitätszuwachs die Folge einer fortschreitenden Umlagerung des Proteins im Bereich des aktiven Zentrums ist.

Nach etwa zwei Stunden faltet sich das bis dahin ellipsoidartig geformte Protein und nimmt eine eher kugelförmige Gestalt an, so wie sie dem Holoenzym zugeschrieben wird. Nach dieser Faltung ist es dem FAD sehr viel leichter möglich, sich über einen π -Komplex an Histidin anzulagern. Die Rückbildung zum Holoenzym ist zwar noch nicht abgeschlossen, aber offenbar doch schon so weit fortgeschritten, daß das Resyntheseprodukt seine katalytische Aktivität zu etwa 60 % wiedererlangt hat.

Notwendige Umlagerungen des Proteins zur endgültigen Fixierung des FAD am Protein sind nach 20 Stunden abgeschlossen, doch der hydrophobe Bezirk hat sich noch nicht vollständig ausgebildet. Eine weitere Umlagerung schafft die Voraussetzung dazu. Diese Umlagerung wirkt sich allerdings nur im Innern des Moleküls aus und verändert die schon seit längerer

Zeit bestehende kugelhähnliche äußere Gestalt des Enzyms nicht oder nur unwesentlich.

Die Tatsache, daß sich der hydrophobe Bezirk erst so spät ausbildet, mag darin begründet liegen, daß diejenigen hydrophoben Aminosäuren, die für die Bildung des hydrophoben Bereiches mitverantwortlich sind, dem aktiven Zentrum von der Primärstruktur her nicht benachbart sind, sondern erst über eine komplizierte Faltung der Eiweißkette in unmittelbarer Nähe des FAD fixiert werden und damit das aktive Zentrum vervollständigen. Man bedenke, daß die Oxynitrilase mit der Molekülmasse von 67 000 u aus etwa 450 Aminosäuren besteht.

Zu etwa ähnlichen Ergebnissen gelangen auch TEIPEL und KOSHLAND [53], wonach bei der Resynthese mehrerer Enzyme zunächst eine grobe Änderung der Tertiärstruktur erfolgt und sich daran eine Änderung der Feinstruktur anschließt, bei welcher die Enzymaktivität wiederhergestellt wird.

Die Änderung der Konformation zwei Stunden nach der Resynthese von der ellipsoiden zur kugelhähnlichen Gestalt vollzieht sich verhältnismäßig gleichzeitig in der gesamten Enzymprobe, denn die gelbe Bande, die auf der Sephadex-Säule als Resyntheseprodukt identifiziert werden kann, bleibt relativ eng zusammen und verbreitert sich nicht (vergl. Abschnitt 4.4.). Bei einer weniger synchron verlaufenden Faltung des Proteins müßten sich dagegen Teile des Resyntheseproduktes aufgrund unterschiedlicher äußerer Gestalt auch unterschiedlich schnell im Sephadex-Gel bewegen. Eine Verbreiterung der Bande wäre die Folge. Die anfänglich schwache Enzymaktivität des Resyntheseproduktes liegt daher weniger in einer geringen Konzentration von Kat begründet, sondern eher in der mangelhaften Funktionalität des Resyntheseproduktes.

7.5. Funktion des FAD

Auf die Funktion des FAD bei der Stabilisierung der Tertiärstruktur weist bereits GERSTNER hin [28]. Das FAD wirkt wie eine Spange, welche das Protein in einer mehr oder weniger kugeligen Form zusammenhält. Eine ähnliche Funktion haben YOSHIMURA und ISEMURA für das FAD einer Glukose-Oxidase ermittelt [54]. Die Tertiärstruktur dieses Enzyms wird durch zwei Moleküle FAD gewährleistet, welche zwei Untereinheiten durch Brückenbildung zusammenhalten. Bei der Oxynitrilase muß die stabilisierende Wirkung des FAD insbesondere auf die Diphosphatgruppe zurückgeführt werden, denn im Gegensatz zum Sörensenpuffer denaturiert das Enzym im Pyrophosphatpuffer kaum. Die Isoenzyme der Oxynitrilase scheinen sich im Holoenzym gegenseitig so weit zu beeinflussen, daß daraus eine gemeinsame Quartärstruktur resultiert, denn beim Holoenzym liegt die Enzymaktivität über denen der einzelnen Isoenzyme.

Das Fluoreszenzspektrum des Resyntheseproduktes unterscheidet sich 20 Stunden nach Resynthesebeginn nicht vom Fluoreszenzspektrum des Holoenzym, so daß die Anlagerung des FAD an das Protein nach dieser Zeit bereits abgeschlossen sein muß. Zwar läßt sich nach 20 Stunden noch eine Erhöhung der Enzymaktivität feststellen, doch wird diese kaum durch das FAD direkt beeinflußt. Vielmehr sollten solche Aktivitätssteigerungen auf Änderungen der Konformation zurückzuführen sein, welche freilich ihrerseits durch die Gegenwart von FAD begünstigt werden.

7.6. Katalysemechanismus

Bei der katalytischen Aktivität der Oxynitrilase zur Bildung optisch aktiver Cyanhydrine scheint das FAD einen unmittelbaren Beitrag zu leisten. Hätte das FAD lediglich die Aufgabe, die Konformation des Holoenzym wiederherzustellen, dann dürf-

te 20 Minuten nach Resynthesebeginn keine katalytische Aktivität des Resyntheseproduktes festzustellen sein. Weder die Tertiärstruktur hat sich in dieser Zeit zurückgebildet (die Tertiärstruktur gleicht nach 20 Minuten im wesentlichen der des Apoenzyms), noch hat sich im Bereich des aktiven Zentrums ein hydrophober Bezirk ausgebildet. Wenn dennoch das Resyntheseprodukt Kat in diesem Zustand bereits katalytische Aktivität aufweist, dann muß das FAD daran unmittelbar beteiligt sein; immerhin ist das FAD zu diesem Zeitpunkt schon mindestens 15 Minuten lang an das Protein gebunden.

Was den Katalysemechanismus im engeren Sinne betrifft, so ist noch nicht all zu viel darüber bekannt. Wie KISSLINGER zeigen konnte, bildet das Enzym zunächst einen Komplex mit Blausäure, erweitert diesen Komplex dann zu einem Blausäure-Benzaldehyd-Enzym-Komplex und bildet sich anschließend unter Freisetzung von optisch aktivem Mandelsäurenitril zum reinen Enzym zurück [11]. GERSTNER und PFEIL weisen auf die Notwendigkeit des hydrophoben Bereiches zur Bildung einer ausreichend hohen Konzentration an Blausäure am aktiven Zentrum hin [55].

Wenn man bedenkt, daß die Fluoreszenz der Oxynitrilase gegenüber dem freien FAD zwar erheblich niedriger liegt, aber dennoch nicht völlig verschwunden ist, sollte auch am nativen Enzym ein Gleichgewicht zwischen zwei verschiedenen Zuständen des FAD vorliegen. In dem einen Zustand ist das FAD außer über die Diphosphatgruppe und den Adenosinteil auch mit dem Isaloxazinteil am Protein gebunden oder liegt in der Sandwichform vor und fluoresziert daher nicht. In dem anderen Zustand haftet das FAD nur über den Adenosinteil und über die Diphosphatgruppe am Protein, wobei sich der Flavinteil vom Protein oder vom Adeninteil löst und fluoresziert (vergl. Abschnitt 3.3.). Aus der Gesamtfluoreszenz wird deutlich, daß solch ein Gleichgewicht zum ersten Zustand hin verschoben ist.

Ein möglicher Katalysemechanismus zur Bildung des Mandelsäurenitrils kann im folgenden gesehen werden:

- 1) Aufgrund der Hydrophobie des aktiven Zentrums und der dadurch erhöhten HCN-Konzentration wird an einer Base in der Nähe des aktiven Zentrums ein Blausäuremolekül angelagert und aktiviert.
- 2) Der Flavinteil des FAD kann sich vom Adeninteil lösen und Benzaldehyd über eine hydrophobe Bindung fixieren. Wenn sich nun der mit Benzaldehyd beladene Isalloxazinteil in Richtung auf die Blausäure streckt, können Benzaldehyd und Blausäure in sterisch richtiger Lage miteinander in Berührung kommen und zu Mandelsäurenitril synthetisiert werden.
- 3) Das Cyanhydrin spaltet sich ab, und der Vorgang wiederholt sich.

8. Zusammenfassung

- 1) Die Oxynitrilase ist ein Komplex aus drei Isoenzymen mit unterschiedlich großen Anteilen. Jedes Isoenzym hat die Molekülmasse 67 000 u und bindet 1 mol FAD auf 1 mol Protein. Die Enzymaktivität steigt von Iso 1 über Iso 2 und Iso 3 zum Holoenzym an. Im Holoenzym erreichen die drei Isoenzyme aufgrund gegenseitiger Beeinflussung eine größere Enzymaktivität als jedes Isoenzym allein.
- 2) Das Fluoreszenzspektrum und das UV/Vis-Spektrum der Oxynitrilase werden maßgeblich von der prosthetischen Gruppe FAD geprägt. Die Fluoreszenzausbeute des Enzyms beläuft sich bei pH 7,5 auf 9 % der FAD-Fluoreszenz.
- 3) Die Oxynitrilase läßt sich gemäß der Reaktionsgleichung
$$\text{APO} + \text{FAD} \rightleftharpoons \text{Oxase}$$
reversibel spalten und resynthetisieren.
- 4) Die Spaltung in FAD und Apoprotein setzt bei pH-Erniedrigung ein und läuft rasch und ohne erkennbare Zwischenstufen in einer Reaktion erster Ordnung ab. Bei pH 7,3 ist das Enzym am stabilsten. Das von FAD befreite Apoprotein neigt zu starker Denaturierung.
- 5) Die Resynthese aus Apoprotein und FAD erfolgt am günstigsten bei pH 7,3 und verläuft langsam über mehrere Zwischenstufen:
 1. Schritt: spontane Anlagerung des FAD an das Apoprotein unter starker Fluoreszenzminderung in einer Reaktion zweiter Ordnung.
 2. Schritt: innermolekulare Umordnung mit Wiederherstellung einer schwachen Enzymaktivität nach 20 Minuten. Das Protein hat nach 20 Minuten noch die ellipsoide Gestalt des Apoproteins. Rasche Zunahme der Aktivität.

3. Schritt: innermolekulare Umlagerung zur Ausbildung einer mehr kugeligen Konformation nach zwei Stunden mit einer weiteren Zunahme der Enzymaktivität.
 4. und weitere Schritte: innermolekulare Umlagerungen mit Wiederherstellung des hydrophoben Bereiches am aktiven Zentrum nach mehr als 18 Stunden. Das Resyntheseprodukt erreicht nach 60 Stunden 91 % seiner theoretischen Enzymaktivität.
- 6) Bei pH 4 und 25 °C werden Spaltung und Resynthese von den folgenden thermodynamischen Größen bestimmt:
- $$\begin{aligned}\Delta G^{\circ} &= - 2,8 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \\ \Delta H^{\circ} &= - 3,6 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \\ \Delta S^{\circ} &= - 2,7 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}\end{aligned}$$
- 7) ADP hemmt die Resynthese zu Beginn stark, läßt aber nach rund 20 Stunden in der Hemmwirkung nahezu völlig nach. FMN hemmt bei der Resynthese etwas weniger als ADP, bleibt aber im Gegensatz zu ADP in der Hemmwirkung über die ersten 20 Stunden gleichmäßig stark. Rb liegt in seiner Hemmwirkung unter FMN.
- 8) Bei der Inkubation des Enzyms mit den Inhibitoren hemmt FMN stark und Rb etwas schwächer. ADP zeigt keine Hemmwirkung.
- 9) FAD ist mehrfach, aber nicht kovalent an das Protein gebunden. Die Diphosphatgruppe haftet ionisch am Protein und stabilisiert die Tertiärstruktur. Unterhalb pH 1,78 beschleunigt die Protonierung der Diphosphatgruppe die Spaltung der Oxynitrilase wesentlich stärker als oberhalb pH 1,78. Flavinteil und Adenosinteil sind über Wasserstoffbrücken gebunden, wobei den Stickstoffatomen des Adenins, den Hydroxygruppen und vermutlich auch den Stickstoffatomen des Isalloxazinteiles in 1- und in 5-Stellung besondere

Bedeutung zukommen. Das FAD ist ferner entweder über den Adeninteil oder über den Isalloxazinteil vermutlich hydrophob an Histidin gebunden. Die Protonierung der Seitengruppe des Histidins wirkt auf die Resynthese hemmend und auf die Spaltung fördernd. Die Protonierung eines nicht näher identifizierten Zentrums mit $pK_S = 8,4$ beschleunigt die Resynthese und hemmt die Spaltung des Enzyms.

- 10) Als möglicher Katalysemechanismus der Oxynitrilase sei folgender Ablauf angeführt:

Ein Blausäuremolekül ist im hydrophoben Bereich des aktiven Zentrums "in Reichweite" des FAD fixiert. Das FAD selbst haftet mit dem Adeninteil und der Diphosphatgruppe am Protein und kann mit dem Flavinteil aus einer Gleichgewichtslage heraus frei schwingen. Über eine hydrophobe Bindung erfaßt es mit dem Isalloxazinteil ein Molekül Benzaldehyd und bringt beide Substrate in sterisch richtiger Lage zusammen. Das dort synthetisierte Mandelsäurenitril wird abgestoßen.

Übersicht über den Verlauf der Resynthese

Zeit	Resynthese	Aktivität
0 min	APO weist ellipsoide Konformation auf, Fluoreszenzabfall, FAD lagert sich an	keine Aktivität
20 min		Beginn der katalytischen Wirksamkeit, stärkste Zunahme der Aktivität
60 min		Aktivität erreicht 50 % des theoretischen Wertes, schwächere Zunahme der Aktivität
2 Std.	grobkörmige Umlagerung der Konformation zu einer mehr kugelförmigen Gestalt wie beim Holoenzym	
18 Std.	hydrophober Bezirk hat sich im aktiven Zentrum noch nicht ausgebildet	
20 Std.	FAD ist bereits fest an das Protein gebunden	
nach 20 Std.	Umlagerung des Proteins und Ausbildung des hydrophoben Bezirks	
2 Tage	nennenswerte Überlagerung von Resynthese und steigender Denaturierung	
60 Std.		Aktivität erreicht 91 % des theoretischen Wertes
4 Tage	Resynthese zum Holoenzym ist abgeschlossen	ständige Denaturierung vermindert die Aktivität

Praktischer Teil

9. Reindarstellung der Oxynitrilase

Die Reindarstellung der Oxynitrilase erfolgt nach dem von BECKER beschriebenen Verfahren [56], welches von MEHNER [57] verbessert wurde. Ausgangsstoff ist entfettete Bittermandelkleie (*Prunus amygdalus*). 750 g Mandelkleie werden in 7 l Wasser aufgeschlämmt, mit NH_3 auf pH 7,7 eingestellt und 12 h bis 15 h geschüttelt. Anschließend wird zentrifugiert und der Überstand mit 6 M Essigsäure auf pH 5,4 gebracht. Nach 12 h Verweilzeit im Kühlschrank zentrifugiert man erneut, verwirft den Niederschlag und stellt den Überstand auf pH 7,5 ein, um Denaturierung in dem schwach sauren Medium zu vermeiden. Außerdem empfiehlt es sich, zur Vermeidung von Denaturierungsverlusten von nun an die Arbeitstemperatur ständig merklich unter Zimmertemperatur zu halten.

Der Überstand wird nun über ein Ultrafilter (verwendetes Fabrikat: Amicon, Filter XM 50) mit Stickstoff bei einem Druck von rund $5 \cdot 10^5 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$ auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens eingeengt. Zur Abtrennung weiterer Begleitstoffe gibt man das Konzentrat auf eine Säule mit Sephadex G 100. Um die Sephadex-Säule vor unlöslichem Niederschlag (zumeist denaturierten Eiweißstoffen), wie er beim Einengen in der Ultrafiltrationszelle auftritt, zu verschonen, empfiehlt es sich, das Konzentrat unmittelbar vor dem Aufbringen auf die Säule noch einmal etwa 20 min bei 6000 g zu zentrifugieren.

Eine Säule mit 2,20 m Länge und 5 cm Durchmesser sollte mit höchstens 200 ml Konzentrat beladen werden. Als Elutionsmittel hat sich 0,1 M Na-Pyrophosphatpuffer pH 7,5 bei einer Elutionsgeschwindigkeit von $18 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ gut bewährt. Die Oxynitrilase (1. Reinigung) wird im Fraktionssammler aufgefangen und mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgesalzen, der schmutzig-gelbe Niederschlag wird 30 min bei 40 000 g zentrifugiert, mit mög-

lichst wenig Pyrophosphatpuffer wieder gelöst und zur 2. Reinigung erneut auf die Sephadex-Säule aufgetragen. Beim zweiten und jedem weiteren Reinigungslauf sollte die Flüssigkeitsmenge 100 ml nicht übersteigen. Nach drei bis vier Reinigungsläufen läßt sich ein hochreines, leuchtend gelbes Präparat der Oxynitrilase erhalten, welches im ausgesalzenen und zentrifugierten Zustand im Kühlschrank über Monate aufbewahrt werden kann.

10. Auftrennung der Oxynitrilase in ihre Isoenzyme

Die Auftrennung der Oxynitrilase in ihre Isoenzyme wurde erstmals von ASCHHOFF [40] über Ionenaustauscher durchgeführt. Das hier beschriebene Verfahren wurde geringfügig modifiziert.

Die Vorbereitung der Trennsäule umfaßt das Quellen und Beladen der Austauschercellulose (Whatman DE 32, Hersteller: W & R. Balston Ltd., Maidstone, England) nach Vorschrift des Herstellers. Wichtig ist dabei die Entgasung im Vakuum, denn absorbiertes CO_2 mindert die Trennleistung erheblich. Zum Schluß wird der Ionenaustauscher mit 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6,0 äquilibriert und in Austauschersäulen mit 30 cm Länge und 3 cm Durchmesser eingefüllt.

Die mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgesalzene Oxynitrilase wird an einer Sephadex-G-50-Säule entsalzen oder - je nach der vorhandenen Konzentration oder Flüssigkeitsmenge - gegen destilliertes Wasser dialysiert. Steht eine ausreichende Austauscherkapazität zur Verfügung, so kann man auch die letzte Reinigung des Holoenzym an Sephadex G 100 gemäß dem vorigen Kapitel mit 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6,0 als Elutionsmittel durchführen und anschließend die Oxynitrilase-Fraktion direkt auf den Ionenaustauscher aufbringen. Bei der angegebenen Größe

der Austauschersäule können 180 mg Oxynitrilase als Obergrenze für eine befriedigende Auftrennung in die Isoenzyme gelten.

Als Elutionsmittel dient Na-Phosphatpuffer pH 6,0. Die Änderung des Konzentrationsgradienten des Elutionspuffers erreicht man, indem man zu einem 2 l-Vorratsgefäß mit 0,01 M Phosphatpuffer aus einem zweiten Behälter 0,15 M Phosphatpuffer zufließen läßt.

Zuflußgeschwindigkeit und Durchflußgeschwindigkeit durch den Ionenaustauscher werden mit einer Laborpumpe auf $24 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ geregelt.

Die Wanderung der Oxynitrilase ist an der gelben Färbung gut zu erkennen. Mittels eines Durchflußphorometers (Durchflußphotometer Uvicord und Fallbügelschreiber der Firma LKB, Stockholm, Schweden) werden die einzelnen Isoenzymfraktionen registriert und im Fraktionssammler aufgefangen. Die Übergangsfractionen von Iso 1 zu Iso 2 bzw. Iso 2 zu Iso 3 werden gemeinsam mit neuem Holoenzym einem weiteren Trennungsgang unterworfen. Lediglich die Mittelfractionen der einzelnen Isoenzyme wurden für die folgenden Untersuchungen verwandt.

Reinheitsprüfungen wurden mittels Diskelektrophorese durchgeführt. Die Konzentrationen der Stammlösungen für Sammel- und Trenngel mit dem auf die Oxynitrilase abgestimmten Vernetzungsgrad einschließlich der Färbemethode sind bei GERSTNER [2] ausführlich beschrieben.

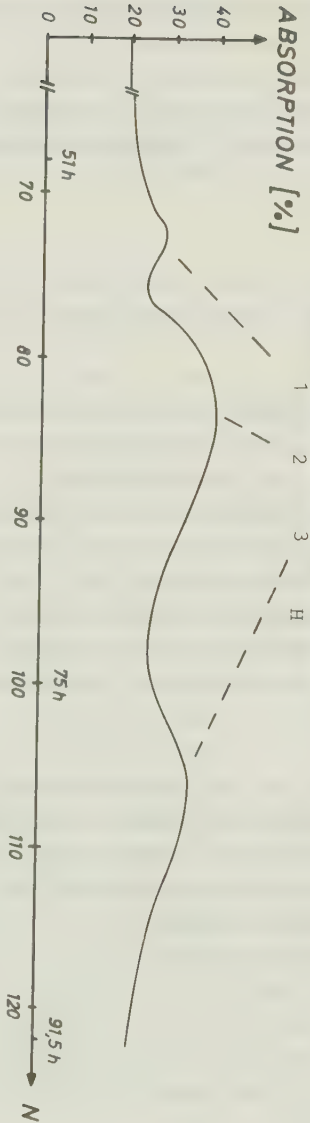


Abb. 25

Elutionsprofil zur Auftrennung der Oxyntilase in ihre Isoenzyme mittels Gradientenelution auf Whatman-Cellulose DE 52, Elution mit 0,15 M Phosphatpuffer gegen 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,0, Säulengröße: 30 cm Länge und 3 cm ϕ , Durchflugeswindigkeit: 24 ml·h⁻¹, Absorption bei 253 nm

Diskelektropherogramme: (1) Iso 1, (2) Iso 2, (3) Iso 3 und (H) HOLO

11. Fluoreszenzmessungen

11.1. Meßgerät und Eichkurven

Die Fluoreszenzmessungen wurden am Meßgerät Fluorispec, Model SF 100 (Hersteller: Baird-Atomic) durchgeführt. Zur Ermittlung der Eichkurven wurde im Handel erhältliches FAD benutzt (Hersteller: Fluka, Buchs, SG, Schweiz) und die Fluoreszenz des FAD in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur und Konzentration gemessen.

Die größte Fluoreszenzausbeute erhält man bei einer optischen Anregung von $\lambda_{\text{Ex}} = 470 \text{ nm}$ und einer Emission von $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$ (Abb. 3), und zwar unabhängig vom gewählten pH-Wert, wenngleich auch die absolute Fluoreszenzausbeute ganz wesentlich vom pH-Wert abhängt. Sie steigt vom stark sauren

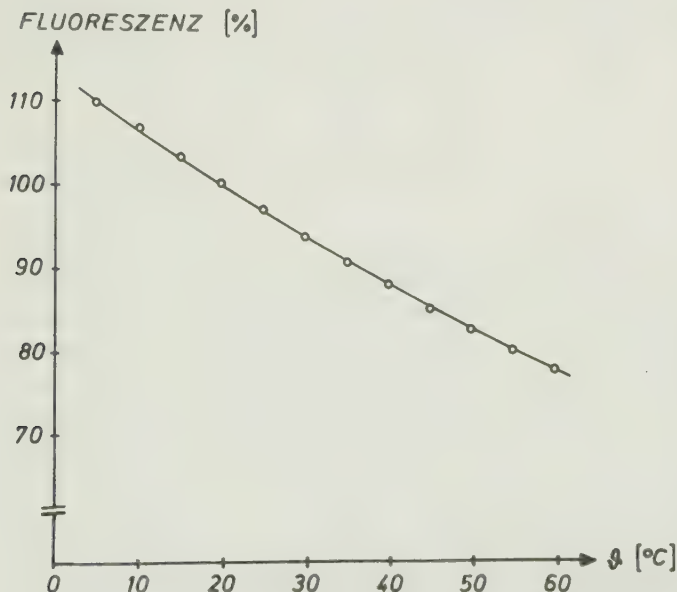


Abb. 26

Fluoreszenzänderung des FAD in Abhängigkeit von der Temperatur, der 100 %-Standard entspricht der FAD-Fluoreszenz bei 20 °C

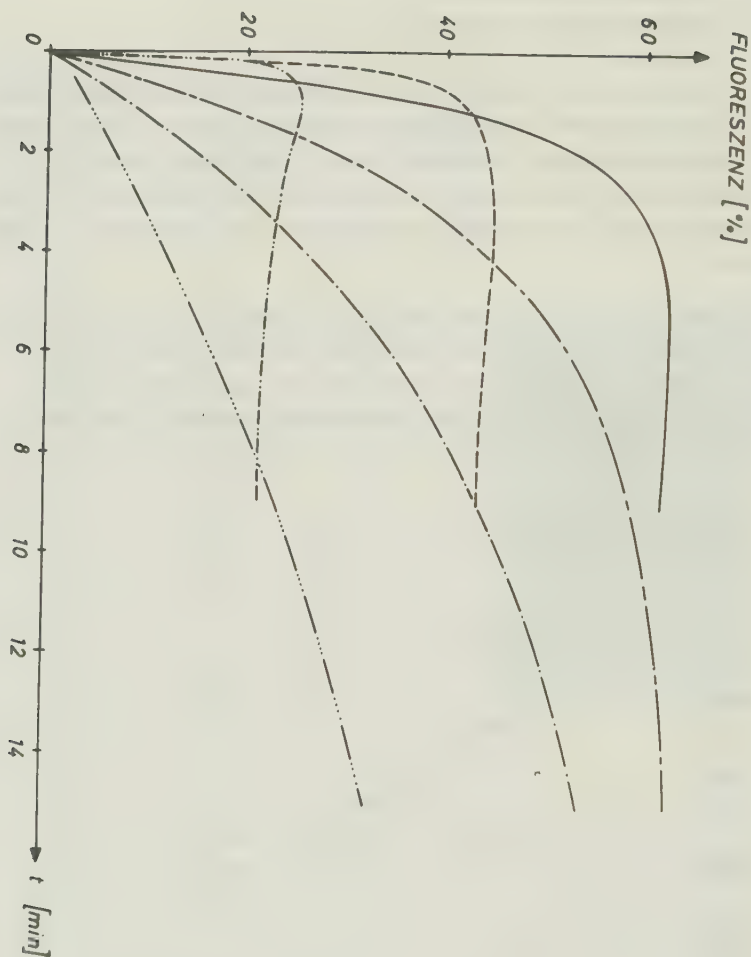


Abb. 27

Fluoreszenzänderung bei der Spaltung von $4,8 \cdot 10^{-6}$ M Oxynitrilase bei

-----	pH 0,4	-----	pH 0,8
-----	pH 1,2	-----	pH 1,6
-----	pH 2,4	-----	pH 2,0

jeweils 20°C , der 100 %-Standard entspricht der Anzeigegrenze des Meßgerätes

Bereich bis pH 2,61 an, erreicht dort ihr Maximum und fällt bis pH 6 auf rund ein Fünftel des Maximalwertes zurück. Dieser Wert wird bis pH 9 beibehalten und fällt dann leicht, ab pH 11 stärker ab und verschwindet bei pH 12,5 (Abb. 1).

Setzt man die Fluoreszenz einer FAD-Probe bei 20 °C gleich 100 %, dann nimmt sie bei 5 °C 110 % an und fällt mit zunehmender Temperatur kontinuierlich ab, erreicht bei 40 °C 88 % und bei 60 °C nur noch 78 % des 20 °C-Standards.

Bei FAD-Konzentrationen unterhalb $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ verhalten sich Fluoreszenz und Konzentration proportional zueinander, dagegen tritt oberhalb $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eine immer stärkere Fluoreszenzlöschung, die sogenannte Konzentrationslöschung, ein. Lagen die FAD-Konzentrationen bei einer Spaltung oder Resynthese über $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, dann wurden die entsprechenden Konzentrationen nach den gemessenen Fluoreszenzwerten anhand eines Ausgleichspolynoms dritten Grades nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt.

11.2. Spaltungsreaktion

11.2.1. pH-Bereich

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß auch das native Enzym in gewissem Umfang fluoresziert. Um den durch intaktes Holoenzym verursachten Meßfehler bei der Bestimmung der FAD-Konzentration so gering wie möglich zu halten, wurde vorwiegend bei pH 2,61 gearbeitet, denn bei diesem pH erreicht die FAD-Fluoreszenz ihren größten Wert, d.h. bei pH 2,61 beläuft sich die Oxynitrilase-Fluoreszenz auf nur 9 % der FAD-Fluoreszenz. Außerdem ist das FAD bei diesem pH verhältnismäßig stabil, während es bei kleineren pH-Werten leicht protolytisch angegriffen wird (vergl. Abb. 27, pH 0,4). Erst oberhalb pH 1,6 kann die Protolyse des FAD vernachlässigt werden.

Noch bedeutsamer als für das FAD ist der pH-Wert für das Protein. Unterhalb pH 1,6 sind Messungen der Spaltungsreaktion nicht möglich, denn wegen der zu starken Denaturierung des Proteins verhindert die Trübung in der Küvette eine genaue Verfolgung der Reaktion.

Die Begrenzung des pH-Bereichs bei pH 4,55 nach oben ergibt sich aus der immer langsamer werdenden Reaktionsgeschwindigkeit und der immer stärker einsetzenden Rückreaktion.

11.2.2. Durchführung der Messung

Als Reaktionsgefäß dient eine an einen Thermostaten angeschlossene 1 cm-Quarz-Küvette (wegen der geringen Fluoreszenz ist eine Schichtdicke von 1 cm unerlässlich). Zunächst wird 1 ml Puffer mit dem erforderlichen pH-Wert in der Küvette vorgelegt. Zur Zeit $t = 0$ werden 0,5 ml Enzymlösung mit einer Spritze eingemessen, sofort mit einer Pipette durchgemischt und das Küvettenfach verschlossen. Im allgemeinen läßt sich der erste Fluoreszenzwert nach 15 Sekunden ablesen, und nach jeweils 15 Sekunden folgt ein weiterer Meßwert. Um Nebeneffekte zu unterdrücken (Protolyse des FAD, Denaturierung des Enzyms, Einsetzen der Gegenreaktion), wird die Reaktion nach 6 min abgebrochen. Diese Zeit reicht aus, um eine sinnvolle Auswertung der Meßdaten zu gewährleisten.

Die eingesetzte Konzentration der Enzymlösung vor dem Mischen mit dem Puffer reicht von

$$0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \quad (= 7,14 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1})$$

$$\text{bis} \quad 2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \quad (= 2,86 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1})$$

in 0,05 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten am Zeiss-Spektralphotometer PMQ III.

Als Spaltungspuffer dient ein 0,5 M Glycin/HCL-Puffer bzw. ein 0,5 M Azetatpuffer. Der vorgelegte pH-Wert ist jeweils so gewählt, daß die Mischung aus Spaltungspuffer und Enzym-lösung den geforderten pH-Wert ergibt.

Tabelle 8

Geschwindigkeitskonstanten der Spaltung in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 20 °C

Holo

pH	k_{-1} in s^{-1}	$\ln k_{-1}$
1,62	$1,11 \cdot 10^{-2}$	- 4,5
1,82	$3,89 \cdot 10^{-3}$	- 5,55
2,02	$2,29 \cdot 10^{-3}$	- 6,08
2,2	$1,75 \cdot 10^{-3}$	- 6,35
2,38	$1,29 \cdot 10^{-3}$	- 6,65
2,59	$1,01 \cdot 10^{-3}$	- 6,90
2,79	$7,85 \cdot 10^{-4}$	- 7,15
3,02	$6,11 \cdot 10^{-4}$	- 7,40
3,7	$3,04 \cdot 10^{-4}$	- 8,10
4,3	$1,58 \cdot 10^{-4}$	- 8,75

Iso 3

pH	k_{-1} in s^{-1}	$\ln k_{-1}$
1,62	$8,77 \cdot 10^{-3}$	- 4,74
2,12	$1,88 \cdot 10^{-3}$	- 6,28
2,59	$8,36 \cdot 10^{-4}$	- 7,09
3,08	$7,47 \cdot 10^{-4}$	- 7,20
3,56	$2,55 \cdot 10^{-4}$	- 8,28
4,05	$1,79 \cdot 10^{-4}$	- 8,63
4,55	$6,79 \cdot 10^{-5}$	- 9,60

Iso 2

pH	k_{-1} in s^{-1}	$\ln k_{-1}$
1,62	$9,0 \cdot 10^{-3}$	- 4,71
2,12	$2,08 \cdot 10^{-3}$	- 6,18
2,59	$7,64 \cdot 10^{-4}$	- 7,18
3,08	$4,53 \cdot 10^{-4}$	- 7,70
3,56	$2,41 \cdot 10^{-4}$	- 8,33
4,05	$1,20 \cdot 10^{-4}$	- 9,03
4,55	$3,65 \cdot 10^{-5}$	- 10,22

Iso 1

pH	k_{-1} in s^{-1}	$\ln k_{-1}$
1,62	$6,94 \cdot 10^{-3}$	- 4,97
2,12	$1,54 \cdot 10^{-3}$	- 6,48
2,59	$1,39 \cdot 10^{-3}$	- 6,58
3,08	$6,92 \cdot 10^{-4}$	- 7,28
3,56	$2,81 \cdot 10^{-4}$	- 8,18
4,05	$1,63 \cdot 10^{-4}$	- 8,72
4,55	$9,17 \cdot 10^{-5}$	- 9,30

Mittel aus allen Kurven, graphisch ausgeglichen

pH	k_{-1} in s^{-1}	$\ln k_{-1}$
1,62	$8,92 \cdot 10^{-3}$	- 4,72
1,8	$3,15 \cdot 10^{-3}$	- 5,76
2	$2,18 \cdot 10^{-3}$	- 6,13
2,5	$1,07 \cdot 10^{-3}$	- 6,84
3	$5,81 \cdot 10^{-4}$	- 7,45
3,5	$3,10 \cdot 10^{-4}$	- 8,08
4	$1,67 \cdot 10^{-4}$	- 8,70
4,3	$1,12 \cdot 10^{-4}$	- 9,10

Tabelle 9

Geschwindigkeitskonstanten der Spaltung der Oxynitrilase
in Abhängigkeit von der Temperatur bei pH 2,6

Holo

T in K	k_{-1} in s^{-1}	$\ln k_{-1}$
283	$3,31 \cdot 10^{-4}$	- 8,01
293	$7,47 \cdot 10^{-4}$	- 7,20
303	$1,72 \cdot 10^{-3}$	- 6,37
313	$4,26 \cdot 10^{-3}$	- 5,46
323	$7,82 \cdot 10^{-3}$	- 4,85
333	$9,77 \cdot 10^{-3}$	- 4,63

Iso 3

283	$5,18 \cdot 10^{-4}$	- 7,57
293	$8,90 \cdot 10^{-4}$	- 7,02
303	$1,59 \cdot 10^{-3}$	- 6,44
313	$3,51 \cdot 10^{-3}$	- 5,65
323	$4,96 \cdot 10^{-3}$	- 5,31

Iso 2

283	$4,43 \cdot 10^{-4}$	- 7,72
293	$7,76 \cdot 10^{-4}$	- 7,16
303	$1,45 \cdot 10^{-3}$	- 6,54
313	$3,08 \cdot 10^{-3}$	- 5,78
323	$4,79 \cdot 10^{-3}$	- 5,34

Iso 1

283	$2,78 \cdot 10^{-4}$	- 8,19
287	$3,92 \cdot 10^{-4}$	- 7,84

11.2.3. Auswertung

Da es bei der Auswertung der Spaltungsreaktion auf charakteristische Größen, die von den eingesetzten Konzentrationen der Reaktionspartner unabhängig sind, ankommt, wurde auf die Angabe der jeweiligen Anfangsgeschwindigkeit v_0 verzichtet. Dafür wurde die Geschwindigkeitskonstante k_{-1} gewählt.

Die Angabe der Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} erfolgt über

$$\frac{df}{dt} = \overline{k_{-1}} \cdot e \cdot h^r \quad (36)$$

$$f = [\text{FAD}]$$

$$e = [\text{Oxase}] = [\text{Komb}]$$

$$h = [\text{H}_3\text{O}^+]$$

Da sich die Reaktionsordnung r bezüglich der H_3O^+ -Ionen innerhalb des betrachteten pH-Intervalls ändert, läßt sich k_{-1} als eine Funktion der H_3O^+ -Ionenkonzentration angeben.

$$k_{-1} = \overline{k_{-1}} \cdot h^r \quad (37)$$

Die eigentliche Konstante ist dabei $\overline{k_{-1}}$. Für feste pH-Werte ist auch k_{-1} eine Konstante (bzw. nur von der Temperatur abhängig). In dieser Form läßt sich die Spaltung als eine Reaktion erster Ordnung beschreiben.

11.3. Erste Stufe der Resynthese

11.3.1. Darstellung des Apoproteins

Die Herstellung der Apoproteinlösung erfolgt nach einer leicht modifizierten Arbeitsvorschrift von ASCHHOFF [8], welche ihrerseits auf NYGAARD und THEORELL [35] und STRITTMATTER [12] zurückgeht. Alle Arbeitsgänge werden bei einer Temperatur unter 2 °C ausgeführt, um vorzeitige Denaturierung zu vermeiden. Entsprechend werden alle Lösungen und Pipetten

auf diese Temperatur vorgekühlt. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die Spaltung in einem durchsichtigen Zentrifugenglas auszuführen, welches in ein Becherglas mit Eiswasser eintaucht. Die Durchsicht durch beide Gläser reicht aus, um alle Arbeitgänge sicher vornehmen zu können. Als Spaltungslösungen dienen eine 3 M KBr-Lösung und eine schwefelsaure $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wird mit 1 M H_2SO_4 auf pH 2,2 eingestellt).

Etwa 20 mg bis 30 mg Oxynitrilase werden in möglichst wenig 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 gelöst, diese Lösung mit gleicher Menge 3 M KBr wie Pyrophosphatpuffer versetzt und durchgemischt. Anschließend gibt man dasselbe Volumen an saurerer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung unter ständigem Durchmischen dazu. Es tritt sofort eine weißgelbe Trübung ein, die die Spaltung des Enzyms und die Ausfällung des Apoproteins durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ anzeigt.

Man läßt das Gemisch 4 min stehen und zentrifugiert anschließend 20 min lang bei 25 000 g. Der gelbe Überstand (FAD) wird verworfen, und der hellgelbe Niederschlag wird erneut mit möglichst wenig Pyrophosphatpuffer gelöst. Dabei ist jede Schaumbildung unbedingt zu vermeiden. Das Protein löst sich wieder langsam zu einer klaren, schwach gelben Lösung auf. Was sich nicht mehr löst, ist denaturiertes Protein und muß entfernt werden. Die schwache Gelbfärbung rührt von nicht abgetrenntem FAD bzw. noch intaktem Holoenzym her, so daß der gesamte Spaltungsvorgang noch zweimal wiederholt werden muß.

Zum Schluß sieht der Niederschlag weiß bis weiß-grau aus und kann nun von der saueren Spaltungslösung befreit werden. Dazu löst man ihn wieder mit wenig Pyrophosphatpuffer auf, trennt denaturiertes Protein durch Zentrifugieren ab, fällt erneut mit gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, zentrifugiert und verwirft den Überstand.

Eine allzu häufige Wiederholung der Spaltungsprozedur übersteht das Protein im allgemeinen nicht, so daß man höchstens viermal hintereinander spalten darf. Aber auch bei nur dreimaliger Spaltung ist der Verlust durch Denaturierung mit über einem Drittel der Ausgangsmenge nicht unerheblich. Nach ASCHHOFF läßt sich der mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällte Niederschlag bei -18°C einfrieren und noch nach zehn Tagen zur Resynthese verwenden. Bei den hier durchgeführten Resynthesen wurde jedoch auf diese Methode verzichtet und das Apoprotein jedesmal frisch hergestellt.

11.3.2. Bestimmung der Extinktion des Apoproteins

Wegen des großen Verlustes durch Denaturierung bei der Spaltung ist es nicht möglich, die Konzentration an Apoprotein aus der eingesetzten Menge des Holoenzym zu bestimmen. Aus diesem Grunde wurde die Extinktion des Apoenzyms aus der 276 nm Bande am Spektralphotometer Cary 15 ermittelt.

2 ml einer $0,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Oxynitrilase-Lösung wurden sauer gespalten und dabei die Zunahme der Extinktion bei 276 nm verfolgt. Aus dem Kurvenverlauf (siehe Abb. 28) wurde die Extinktion $E_{276} = 1,51$ nach 30 min gemessen, woraus sich für die Proteinkonzentration von $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ die Extinktion $E_{276} = 1,89$ bzw. der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{276} = 1,32 \cdot 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ergibt.

Da bei der praktischen Darstellung des Apoproteins die Spaltung nach 30 min abgebrochen wird, wurde auf die Bestimmung des Endwertes, an den sich die Extinktion asymptotisch annähert, verzichtet. Alle folgenden Konzentrationsbestimmungen wurden am Spektralphotometer Zeiss PMQ III ausgeführt.

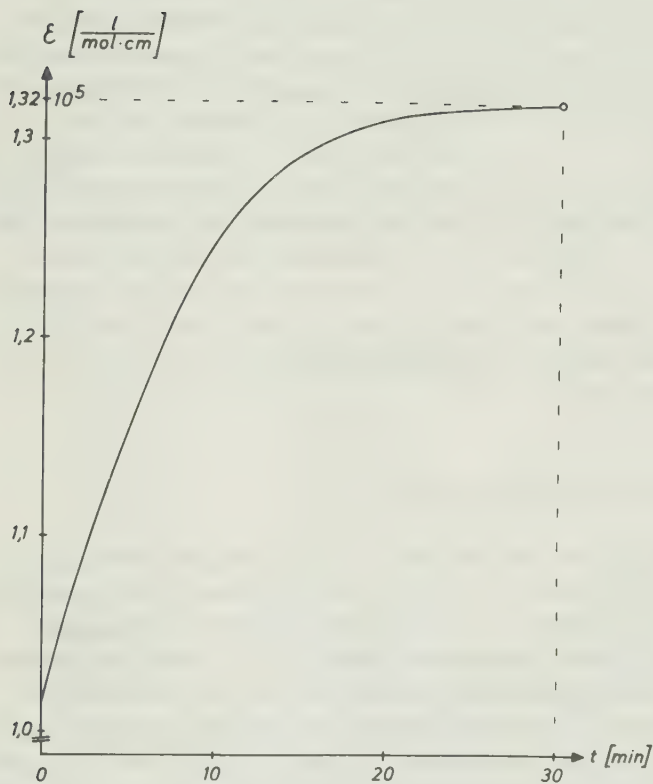


Abb. 28

Bestimmung des Extinktionskoeffizienten des Apoproteins für 276 nm durch Extinktionsänderung während der Spaltung bei pH 2,1; Enzymkonzentration: $1,14 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, Meßgerät: Cary 15

11.3.3. pH-Bereich

Da sich die Oxynitrilase erfahrungsgemäß im neutralen Pyrophosphatpuffer am besten löst und auch am besten gegen Denaturierung geschützt ist [28], wurde der Pyrophosphatpuffer mit pH 7,5 als das geeignetste Lösungsmittel beibehalten und daher auch zur Resynthese eingesetzt. Je weiter der pH sinkt, desto langsamer verläuft die Resynthese, und desto stärker setzt die Spaltung als Gegenreaktion ein. Daher wurde der für die Resynthese gewählte pH-Bereich bei pH 3,9 nach unten begrenzt. Zur Behandlung der pH-Abhängigkeit der Resynthese sollte ein pH-Intervall von 5 pH-Stufen ausreichen, so daß als obere Grenze pH 9 gewählt wurde, zumal BECKER und PFEIL [4] auf die steigende Instabilität des Enzyms im alkalischen Medium hinweisen.

11.3.4. Durchführung der Messung

Die verwandten Konzentrationen werden nach oben durch das Enzym und nach unten durch das FAD festgelegt. Zur Vermeidung unerwünschter Trübung in der Küvette durch Denaturierung (insbesondere bei Temperaturen über 30 °C) wurde die Konzentration an Apoprotein nicht über 2 mg.ml⁻¹, entsprechend $2,86 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ gewählt, während wegen der schwachen FAD-Fluoreszenz die FAD-Konzentration von $2,4 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ nicht unterschritten wurde. Die Gegenreaktion setzt bei der Resynthese verhältnismäßig rasch ein, und bei niedrigen pH-Werten stellt sich das Gleichgewicht innerhalb der ersten 6 Minuten nahezu vollständig ein, so daß auch hier wie bei der Spaltung die Reaktion längstens 6 min verfolgt wurde.

Verwendet wurde derselbe Geräteaufbau wie unter 11.2.2.. Zunächst wurden 0,5 ml Apoproteinlösung in der Küvette vorgelegt und dann das FAD in 1 ml bis 1,5 ml geeignetem Puffer

eingemessen, durchgemischt und im allgemeinen der 15 s-Wert als erster Meßwert abgelesen. Das Apoprotein wurde stets in 0,05 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 eingesetzt (bei Versuchen mit Sörensenpuffer denaturiert das Protein zu schnell), und lediglich über die Wahl des Puffers, in dem das FAD gelöst war, wurde der für die Resynthese gewünschte pH erhalten.

Tabelle 10

Geschwindigkeitskonstanten der Resynthese der Oxynitrilase in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 20 °C

Holo

pH	k_1 in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$\ln k_1$
3,9	$1,67 \cdot 10$	2,82
5,2	$4,33 \cdot 10$	3,77
6,33	$1,04 \cdot 10^2$	4,65
6,83	$1,62 \cdot 10^2$	5,09
7,2	$1,67 \cdot 10^2$	5,12
7,5	$1,57 \cdot 10^2$	5,06
7,91	$1,3 \cdot 10^2$	4,87
8,32	$9,82 \cdot 10$	4,59
8,97	$4,98 \cdot 10$	3,91

Iso 2

pH	k_1 in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$\ln k_1$
4,0	$1,25 \cdot 10$	2,53
4,5	$1,85 \cdot 10$	2,92
5,6	$4,78 \cdot 10$	3,87
6,7	$1,08 \cdot 10^2$	4,68
7,5	$1,3 \cdot 10^2$	4,87
7,8	$1,06 \cdot 10^2$	4,67
9,0	$4,16 \cdot 10$	3,73

Iso 3

pH	k_1	$\ln k_1$
	in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	
4,0	$1,02 \cdot 10$	2,32
4,5	$1,51 \cdot 10$	2,72
5,6	$3,47 \cdot 10$	3,55
6,7	$7,11 \cdot 10$	4,26
7,5	$1,04 \cdot 10^2$	4,65
7,8	$8,52 \cdot 10$	4,44
9,0	$3,44 \cdot 10$	3,54

Mittel

pH	$\ln k_1$ ¹⁾	k_1
		in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
3 ²⁾	1,93	6,89
4	2,68	$1,46 \cdot 10$
5	3,45	$3,15 \cdot 10$
6	4,21	$6,74 \cdot 10$
7	4,9	$1,34 \cdot 10^2$
7,3 ²⁾	4,99	$1,47 \cdot 10^2$
7,5	4,89	$1,33 \cdot 10^2$
8	4,65	$1,05 \cdot 10^2$
9	3,81	$4,52 \cdot 10$

1) Werte wurden aus den Meßkurven von HOLO, Iso 2 und Iso 3 graphisch ausgeglichen (Abb. 11b).

2) Werte wurden aus der Kurve der Abb. 11b extrapoliert bzw. interpoliert.

Tabelle 11

Geschwindigkeitskonstanten der Resynthese der Oxynitrilase
in Abhängigkeit von der Temperatur bei pH 7,5

HOLO

T	k_1	$\ln k_1$
in K	in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	
283	$7,96 \cdot 10$	4,38
293	$1,3 \cdot 10^2$	4,87
303	$1,96 \cdot 10^2$	5,28

Iso 2

T	k_1	$\ln k_1$
in K	in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	
283	$7,44 \cdot 10$	4,31
293	$1,12 \cdot 10^2$	4,72
303	$1,85 \cdot 10^2$	5,22

Iso 3

T	k_1	$\ln k_1$
in K	in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	
283	$6,45 \cdot 10$	4,17
293	$9,09 \cdot 10$	4,51
303	$1,43 \cdot 10^2$	4,96

11.3.5. Auswertung

Aus denselben Gründen wie unter 11.2.3. wurde die Resynthese durch die Geschwindigkeitskonstante k_1 beschrieben. Auch hier wird die Reaktionsgeschwindigkeit gemäß

$$-\frac{df}{dt} = \overline{k_1} \cdot a \cdot f \cdot h^r \quad (38)$$

mit

$$\begin{aligned} a &= [\text{APO}] \\ f &= [\text{FAD}] \\ h &= [\text{H}_3\text{O}^+] \end{aligned}$$

beschrieben. Da sich die Reaktionsordnung bezüglich der H_3O^+ -Ionen innerhalb des betrachteten pH-Intervalls ändert, stellt sich k_1 als Funktion von h dar;

$$k_1 = \overline{k_1} \cdot h^r \quad (39)$$

wobei die eigentliche nur von der Temperatur abhängige Konstante durch $\overline{k_1}$ repräsentiert wird. In dieser Form ist die Resynthese eine Reaktion zweiter Ordnung bezüglich der Reaktionspartner FAD und Apoprotein.

12. Messungen am Polarimeter

12.1. Meßgerät und Substanzen

Die katalytische Wirksamkeit des Enzyms oder dessen Resynthesestufen wurde über die optische Aktivität des gebildeten Mandelsäurenitrils gemessen. Als Meßgerät dazu diente das Perkin-Elmer-Polarimeter 141 mit einer 0,001 °-Einteilung.

Blausäure und Benzaldehyd für den Standarddrehtest wurden unter Stickstoff destilliert und unter Stickstoff im Kühlschrank aufbewahrt. Blausäure wurde eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut. Die Substanzentnahmen erfolgten bei Benzaldehyd und Blausäure im Stickstoffstrom, um Oxidation zu vermeiden bzw. um Kondenswasser fernzuhalten. Die Inhibitoren FMN, Rb, ATP, ADP, AMP, Ado und Ade wurden von der Firma Serva, Heidelberg, und FAD von der Firma Fluka, Buchs, SG, Schweiz, bezogen und ohne zusätzliche Reinigung eingesetzt.

12.2. Standarddrehtest

Qualitativ geht der Standarddrehtest bis auf ROSENTHALER [58] zurück, jedoch erst KISSLINGER [11] vervollkommnete ihn so weit, daß er auch mit geringem Substanzeinsatz bei ausreichender Meßgenauigkeit zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt werden kann. Zur Vorbereitung werden Benzaldehyd und Blausäure auf Raumtemperatur erwärmt. In ein 10 ml-Meßkölbchen werden etwa 8 ml bis 9 ml 0,05 M auf 20 °C temperierter alkoholischer Azetatpuffer pH 5,4 eingefüllt und nacheinander 0,1 ml Benzaldehyd und 0,2 ml einer $1,43 \cdot 10^{-5}$ M Enzymlösung ($= 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) eingemessen. Anschließend wird mit alkoholischem Azetatpuffer auf 10 ml aufgefüllt und gut durchgemischt. Mit einer Spritze werden 0,3 ml Blausäure dazugegeben und die Stoppuhr zur Messung der Reaktionszeit in

Gang gesetzt. (Das Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches beläuft sich also auf 10,3 ml.) Innerhalb der ersten 30 Sekunden ist es möglich, die Reaktionsprobe durchzumischen, mit einer Spritze in eine auf 20 °C thermostatisierte 10 cm-Meßküvette einzufüllen und den ersten Meßwert abzulesen. Alle weiteren 15 Sekunden liest man einen neuen Drehwinkel ab, und nach 6 Minuten bricht man die Synthese des Cyanhydrins ab.

Mißt man die optische Aktivität des Cyanhydrins bei der 436 nm-Quecksilberlinie, so liegt der 6 min-Drehwinkel für die oben erwähnten Substanzmengen bei rund + 0,3 °; entsprechend geringer fällt der Drehwinkel für frisch resynthetisiertes Enzym aus.

Soll die katalytische Aktivität des Resyntheseproduktes bestimmt werden, so gibt man statt des Holoenzym das Resynthesegemisch zum alkoholischen Azetatpuffer und Benzaldehyd. Blausäure wird stets zuletzt hinzugefügt. Grundsätzlich muß auch hier die Apoenzymlösung eiskühlt aufbewahrt werden. Die Mengenverhältnisse zwischen Proteinlösung und Reaktionspuffer sind jedoch so unterschiedlich, daß sich die Proteinlösung im Reaktionsgemisch rasch auf 20 °C erwärmt.

12.3. Auswertung

Die quantitative Beschreibung der katalytischen Wirksamkeit des Enzyms bzw. des Resyntheseproduktes erfolgt über die Angabe der Anfangsgeschwindigkeit v_0 der Cyanhydrinsynthese, welche aus den Drehwinkeln α ermittelt wird. Die direkte Proportionalität zwischen Drehwinkel und eingesetzter Enzymkonzentration ist bekannt [9], und so ergibt sich die Anfangsgeschwindigkeit v_0 über

$$v_o = a_m \cdot e_o \quad (40)$$

mit a_m = molekulare Aktivität
 e_o = Anfangskonzentration des Enzyms.

KISSLINGER gibt für den Standarddrehtest die molekulare Aktivität mit $a_m = 1,058 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ an [11]. Veränderliche v_o -Werte bei Messungen mit Resyntheseprodukten der Oxynitri-lase lassen sich auf unterschiedliche Funktionalität der Resyntheseprodukte zurückführen. Während der Resynthese nimmt die Funktionalität der Resyntheseprodukte ständig zu, so daß die effektive Enzymaktivität bei fortschreitender Resynthese gegen den 100 %-Wert der molekularen Aktivität a_m strebt.

12.4. Inkubationsmessungen

Holoenzym wurde jeweils mit den Inhibitoren FMN, Rb, ATP, ADP, AMP, Ado und Ade im fünffachen Überschuß an Inhibitoren inkubiert und nach 1 Stunde, 3 Stunden, 8 Tagen und 11 Tagen mittels Standarddrehtest auf seine katalytische Aktivität untersucht.

12.5. Resynthesen mit Inhibitoren

Apoprotein und FAD wurden unter Zugabe jeweils eines der Inhibitoren resynthetisiert, und anschließend wurde über den Standarddrehtest die fortschreitende Resynthese anhand steigender v_o -Werte der Cyanhydrinbildung ermittelt. Der Inhibitor wurde im dreifachen Überschuß gegenüber FAD zusammen mit FAD in Lösung vorgegeben und dazu die zu FAD äquivalente Menge Apoprotein eingemessen. Bei Resynthesemessungen wurde das Resyntheseegemisch wie das Holoenzym eingesetzt.

13. Resynthesen auf Sephadex-Gel

Die Resynthesen wurden in einem auf 14 °C temperierten Raum ausgeführt. Zur Resynthese dient eine Glassäule mit 1 cm Durchmesser und einer 105 cm hohen Füllung aus Sephadex G 100 (Hersteller: Pharmacia, Uppsala, Schweden). Man läßt den 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 als Elutionspuffer so weit in das Gel eindringen, bis über dem Gel keine Flüssigkeitssäule mehr steht, und trägt 0,5 ml bis 1 ml FAD-Lösung gewünschter Konzentration ohne Verwirbelung der Gelpartikel auf das Sephadex auf und wartet, bis das FAD ebenfalls in die obere Schicht des Sephadex-Gels eingedrungen ist. Dann trägt man die Apoenzymlösung auf wie zuvor das FAD, und wenn die Proteinlösung in das Gel eingedrungen ist, überschichtet man das Gel wieder mit dem Elutionspuffer.

Wegen der größeren Abmessungen der Proteinmoleküle wandert das Protein im Ausschlußvolumen wesentlich schneller als das FAD durch das Sephadex-Gel, das FAD wird vom Protein eingeholt, und während der Überholungsphase tritt die Rekombination von FAD und Apoprotein ein. Das Reaktionsprodukt Komb wandert ebenfalls schneller als das restliche FAD auf der Säule, so daß sich etwa 10 min bis 12 min nach Auftragen der Apoproteinlösung die zunächst einheitliche gelbe Schicht auf der Säule in zwei gelbe Fraktionen auftrennt und diese über ein Photometer (Hersteller: LKB-Produkter, Stockholm, Schweden) registriert und anschließend im Fraktionssammler aufgefangen werden. Die Durchflußgeschwindigkeit wird mit einer Laborpumpe auf $16 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ eingestellt, wobei gleichzeitig aufgrund des entstehenden Unterdrucks frisches Fließmittel aus einer Vorratsflasche über einen dünnen Schlauch auf die Säule tropft.

14. Molekülmassenbestimmung

14.1. Gelfiltrationsmethode

Der apparative Aufbau bei der Molekülmassenbestimmung entspricht dem, wie er unter 13. beschrieben wurde. Als Eichsubstanzen dienen Ferritin mit 540 000 u (Hersteller: Böhringer, Mannheim), Rinderalbumin mit 67 000 u und Hühneralbumin mit 45 000 u (beides von Serva, Heidelberg). Die Substanzen werden so wie in Kapitel 13. erläutert auf die Säule mit Sephadex G 100 aufgetragen.

Die Zeit vom Aufbringen des Ferritins bis zu dessen Registrierung im Photometer wird als Standardzeit t_o bestimmt. Wegen der direkten Proportionalität zwischen Durchflußzeit t_o , Schreibervorschub s_o und Durchflußvolumen V_o gilt

$$\frac{t_o}{t_{E_i}} = \frac{s_o}{s_{E_i}} = \frac{V_o}{V_{E_i}} \quad (41)$$

wobei

$$t_{E_i}, s_{E_i} \text{ und } V_{E_i}$$

die entsprechende Durchflußzeit, Schreibervorschub und Durchflußvolumen für die jeweiligen Isoenzyme sind. Bei Iso 1 und Iso 3 wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von $8,7 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ und bei Iso 2 mit $9,5 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ gearbeitet.

14.2. Kinetische Methode

Die kinetische Methode zur Molekülmassenbestimmung entspricht genau der unter 11.2.2. beschriebenen. Es wurde lediglich die Temperatur von 20°C auf 30°C erhöht und die Reaktion so lange verfolgt, bis die Fluoreszenzänderung nur noch unwesentliche Werte aufwies.

15. Literaturverzeichnis

- 1 Enzyme Nomenclature, Commission on Biochemical Nomenclature, Elsevier, Scientific Publishing Company, Amsterdam 1973
- 2 E. Gerstner, Dissertation, Marburg 1970
- 3 W. Becker, Diplomarbeit, Marburg 1962
- 4 W. Becker und E. Pfeil, Biochem. Z. 346, 301 (1966)
- 5 N.K. Gupta und B. Vennesland, J. Biol. Chem. 239, 3737 (1964)
- 6 Y. Hatefi, D.L. Stiggall, The Enzymes, 3. Auflage, Bd. 13, 175, Hrsg. P.D. Boyer, Academic Press, New York, San Francisco, London 1976
- 7 D.E. Edmondson, T.P. Singer, FEBS letters 64, 255 (1976)
- 8 H.J. Aschhoff, Diplomarbeit, Marburg 1966
- 9 O. Müller, Staatsexamensarbeit, Marburg 1970
- 10 V. Mätzke, Dissertation, Marburg 1977
- 11 M.J. Kisslinger, Dissertation, Marburg 1974
- 12 P. Strittmatter, J. Biol. Chem. 236, 2329 (1961)
- 13 O.A. Bessey, O.H. Lowry und R.H. Love, J. Biol. Chem. 180, 755 (1949)
- 14 P. Cerletti und N. Siliprandi, Arch. Biochem. Biophys. 76, 214 (1958)
- 15 G. Weber, Biochem. J. 47, 114 (1950)
- 16 B.M. Chassy und D.B. McCormick, Biochemistry 4, 2612 (1965)
- 17 J.C.M. Tsibris, D.B. McCormick und E.D. Wright, Biochemistry 4, 504 (1965)
- 18 D. Voet und A. Rich, Chem. Abstr. 75, 44942 m (1971)
- 19 J. Koziol, Methods Enzymol. 18 B, 253 (1971)
- 20 P. Hemmerich, C. Veeger und S. Wood, Angew. Chem. 77, 699 (1965)
- 21 G. Weber in: Flavins and Flavoproteins, S. 15, Elsevier, Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1966
- 22 B.G. Barman und G. Tollin, Biochemistry 11, 4746 (1972)
- 23 J. Butenuth, Dissertation, Marburg 1971
- 24 J.W. Teipel und D.E. Koshland, Biochemistry 10, 792 (1971)
- 25 E. Hofmann, Dynamische Biochemie II, Enzyme und energieliefernde Stoffwechselreaktionen, Akademie-Verlag, Berlin, Pergamon Press, Oxford, Verlag Vieweg & Sohn, Braunschweig 1970

- 26 E. Schweizer, Chemie in unserer Zeit, 7, 25 (1973)
- 27 B.E.P. Swoboda, Biochim. Biophys. Acta 175, 380 (1969)
- 28 E. Gerstner, Staatsexamensarbeit, Marburg 1966
- 29 R. Knauf, Staatsexamensarbeit, Marburg 1970
- 30 B.E.P. Swoboda, Biochim. Biophys. Acta 175, 365 (1969)
- 31 H. Tsuge und H. Mitsuda, J. Vitaminol. (Kyoto) 17, 24 (1971)
- 32 E. Otaiza und L. Jaenicke, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 385 (1971)
- 33 V. Massey und H. Ganther, Biochemistry 4, 1161 (1965)
- 34 J.W. Hinkson, Biochemistry 7, 2666 (1968)
- 35 A.P. Nygaard und H. Theorell, Acta Chem. Scand. 9, 1587 (1955)
- 36 K.J. Laidler, Reaktionskinetik, BI-Taschenbuch Nr. 290, 290a, Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich 1970
- 37 K. Schwetlick, Kinetische Methoden zur Untersuchung von Reaktionsmechanismen, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1971
- 38 G.M. Barrow, Physikalische Chemie III, uni-text, Verlag Bohmann, Heidelberg, Wien, Verlag Vieweg & Sohn, Braunschweig 1971
- 39 T. Wieland, P. Duesberg und H. Petermann, Biochem. Z. 337, 303 (1963)
- 40 H.J. Aschhoff, Dissertation, Marburg 1968
- 41 V. Massey, G. Palmer und R. Bennett, Biochim. Biophys. Acta 48, 1 (1961)
- 42 D.B. McCormick, J.F. Koster und C. Veeger, Eur. J. Biochem. 2, 387 (1967)
- 43 S.T. Chung, R.T.Y. Tan und J. Suzuki, Biochemistry, 10, 1205 (1971)
- 44 T.P. Singer, J. Salach, P. Hemmerich und A. Ehrenberg, Methods Enzymol. 18 B, 416 (1971)
- 45 W.C. Kenney, W.H. Walker, E.B. Kearney, E. Zeszotek und T.P. Singer, Chem. Abstr. 74, 28281u (1971)
- 46 T.P. Singer und D.E. Edmondson, FEBS letters 42, 1 (1974)
- 47 W.J. Wedenejew, L.W. Gurwitsch, W.H. Kondratjew, W.A. Medwedew und E.L. Frankewitsch, Energien chemischer Bindungen, Ionisationspotentiale und Elektronenaffinitäten, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1971

- 48 H.A. Staab, Einführung in die theoretische organische Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1970
- 49 R. Kuhn und H. Rudy, Ber. Dt.Chem.Ges. 69, 2557 (1936)
- 50 A. Åkeson, A. Ehrenberg und H. Theorell, in: The Enzymes, Bd. VII, 477, Academic Press, New York, London 1963
- 51 D'Ans, Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Bd. 1, Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1967
- 52 A.L. Lehninger, Biochemie, dt. Ausgabe, Verlag Chemie, Weinheim 1975
- 53 J.W. Teipel und D.E. Koshland, Biochemistry 10, 798 (1971)
- 54 T. Yoshimura und T. Isemura, Chem. Abstr. 75, 45106d (1971)
- 55 E. Gerstner und E. Pfeil, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 271 (1972)
- 56 W. Becker, Dissertation, Marburg 1964
- 57 K.H. Mehner, Staatsexamensarbeit, Marburg 1971
- 58 L. Rosenthaler, Biochem. Z. 14, 235 (1908)
- 59 Biochemisches Taschenbuch, Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1964
- 60 V. Freise, Chemische Thermodynamik, BI-Taschenbuch Nr. 213, Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich 1972
- 61 Handbook of Chemistry and Physics, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1970
- 62 P. Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Verlag Georg Thieme, Stuttgart 1970
- 63 H.R. Mahler und E.H. Cordes, Biological Chemistry, Harper & Row, Publishers, New York, Evanston, London and John Weatherhill, Tokyo 1969
- 64 W.H. Westphal, Physik, Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1970

Herrn Prof. Dr. Emanuel Pfeil,
unter dessen Anleitung diese
Arbeit entstand, danke ich für
seinen Rat und seine Hilfe.

Lebenslauf

Ich wurde am 14. Januar 1944 als Sohn des Oberstudien-
direktors Bruno Müller und seiner Ehefrau Charlotte Müller,
geb. Lindemann, in Kassel geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Witzen-
hausen/Werra. Nach dem Besuch der Mittelschule in Großal-
merode, Kreis Witzenhausen, und des Gymnasiums in Hessisch
Lichtenau, Kreis Witzenhausen, legte ich am 4.3.1963 an
der Schwalmschule in Treysa, Kreis Ziegenhain, die Reife-
prüfung ab.

Nach dem Wehrdienst von 1963 bis 1965 studierte ich in
Marburg und Gießen Mathematik und Chemie. Am 14.6.1968
bestand ich an der Philipps-Universität in Marburg die
pädagogische Vorprüfung und am 1.12.1970 die Erste Staats-
prüfung für das Lehramt an Gymnasien in Mathematik und
Chemie.

1973 trat ich den Vorbereitungsdienst im Studienseminar
Gießen an und bin seit der Zweiten Staatsprüfung für das
Lehramt an Gymnasien am 25.1.1975 als Lehrer am Gymnasium
in Kronberg, Hochtaunuskreis, tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten

Aurich, Avakumović, Bartenwerfer, Berz, Borges, Dimroth,
Düker, Franke, Hellner, Hoppe, Huckemann, Kamke, Körner,
Kuhn, Kröhnke, Mahr, Merz, Musso, Neumann, Nöth, Pfeil,
Pickert, Richert, Tent, Wieland, Wirsing und Witzel.

Lebenslauf

Ich wurde am 11. Januar 1911 als Sohn des Ehepaars
Hilmar und Emma Hilmar geboren. Meine Eltern
sind in Garmisch-Partenkirchen im Ortsteil Garmisch
geboren.

Vom 1. April 1911 bis zum 31. März 1912 war ich
in der Volksschule in Garmisch-Partenkirchen
unterrichtet. Nach dem Besuch der Volksschule
wurde ich in die Realschule in Garmisch-Partenkirchen
genommen. Am 1. April 1918 wurde ich in die
Realschule in Tübingen versetzt. Am 1. April 1921
wurde ich in die Realschule in Tübingen versetzt.
Am 1. April 1924 wurde ich in die Realschule in
Tübingen versetzt.

Nach dem Besuch der Realschule in Tübingen
wurde ich in die Realschule in Garmisch-Partenkirchen
genommen. Am 1. April 1924 wurde ich in die
Realschule in Garmisch-Partenkirchen versetzt.
Am 1. April 1927 wurde ich in die Realschule in
Garmisch-Partenkirchen versetzt. Am 1. April 1930
wurde ich in die Realschule in Garmisch-Partenkirchen
versetzt. Am 1. April 1933 wurde ich in die
Realschule in Garmisch-Partenkirchen versetzt.
Am 1. April 1936 wurde ich in die Realschule in
Garmisch-Partenkirchen versetzt.

Am 1. April 1939 wurde ich in die Realschule in
Garmisch-Partenkirchen versetzt. Am 1. April 1942
wurde ich in die Realschule in Garmisch-Partenkirchen
versetzt. Am 1. April 1945 wurde ich in die
Realschule in Garmisch-Partenkirchen versetzt.
Am 1. April 1948 wurde ich in die Realschule in
Garmisch-Partenkirchen versetzt. Am 1. April 1951
wurde ich in die Realschule in Garmisch-Partenkirchen
versetzt. Am 1. April 1954 wurde ich in die
Realschule in Garmisch-Partenkirchen versetzt.

Am 1. April 1957 wurde ich in die Realschule in
Garmisch-Partenkirchen versetzt. Am 1. April 1960
wurde ich in die Realschule in Garmisch-Partenkirchen
versetzt. Am 1. April 1963 wurde ich in die
Realschule in Garmisch-Partenkirchen versetzt.
Am 1. April 1966 wurde ich in die Realschule in
Garmisch-Partenkirchen versetzt. Am 1. April 1969
wurde ich in die Realschule in Garmisch-Partenkirchen
versetzt. Am 1. April 1972 wurde ich in die
Realschule in Garmisch-Partenkirchen versetzt.
Am 1. April 1975 wurde ich in die Realschule in
Garmisch-Partenkirchen versetzt. Am 1. April 1978
wurde ich in die Realschule in Garmisch-Partenkirchen
versetzt. Am 1. April 1981 wurde ich in die
Realschule in Garmisch-Partenkirchen versetzt.

